



# **Analýza nanomateriálů a jejich interakce s bakteriálními populacemi**

## **Bakalářská práce**

*Studijní program:* B3944 – Biomedicínská technika  
*Studijní obor:* 3901R032 – Biomedicínská technika  
*Autor práce:* **Eva Tuláčková**  
*Vedoucí práce:* Ing. Michaela Jakubičková





# Analysis of nanomaterials and their interaction with bacterial populations

## Bachelor thesis

*Study programme:* B3944 – Biomedical Technology  
*Study branch:* 3901R032 – Biomedical Technology  
*Author:* **Eva Tuláčková**  
*Supervisor:* Ing. Michaela Jakubičková



## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eva Tuláčková**  
Osobní číslo: **Z12000021**  
Studijní program: **B3944 Biomedicínská technika**  
Studijní obor: **Biomedicínská technika**  
Název tématu: **Analýza nanomateriálů a jejich interakce s bakteriálními populacemi**  
Zadávací katedra: **Ústav zdravotnických studií**

## Z á s a d y   p r o   v y p r a c o v á n í :

Cíle práce:

Seznámení se s problematikou nanomateriálů (možnosti analýzy, chování v daném prostředí). Vypracování potřebné teorie a zpracování rešerše na dané téma interakce nanomateriálů v biologických aplikacích.

Zpracování metodiky měření a vyhodnocení vzorků (bakteriální kmeny jako například *Escherichia Coli* a *Micrococcus Luteus*), které jsou ovlivňovány působením nanočástic.

Teoretická východiska (včetně výstupu z BP):

V laboratoři se budou pozorovat a vyhodnocovat laboratorní modely s reálnými mikroorganismy. Součástí práce bude měření fyzikálních a chemických parametrů daných modelů. Ve světové literatuře je publikováno, že pomocí vhodné metodiky, jako úpravou povrchu (například s využitím nanočástic  $\text{TiO}_2$  apod.) lze výrazně ovlivnit (utlumit) růst/množení/aktivitu bakteriálních populací vyskytujících se na těchto površích. Cílem práce bude navrhnout vhodnou metodiku k inhibici buněk za využití aplikace nanočástic na povrchy v prostředí, kde je nutné zachovat vysoce sterilní prostředí. Cílem práce bude prověření hypotéz vlivu nanočástic na bakteriální populaci.

Výzkumné otázky:

Hlavní výzkumnou otázkou práce je zaměření se na hodnocení nanomateriálů aplikovaných na povrchové struktury, čehož výsledkem by měla být inhibice bakteriální populace. K posouzení vlivu budou dle dispozic použity metody jako UV-VIS spectroscopy (DRS), transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), dynamic light scattering (DLS). Dosažené výsledky, které budou samostatně v laboratoři změřeny, budou porovnány s literaturou (dle odborné literatury viz níže a dalších vhodných literárních zdrojů).

Metoda:

Kvantitativní

Technika práce, vyhodnocení dat:

Empiricky se bude pozorovat dané měření, a experiment se bude vyhodnocovat jak po stránce porovnávacích experimentů (vzorek vystavený působení nanočástic v porovnání s kontrolním vzorkem) a dále se provede základní statistické vyhodnocení obou experimentů.

Místo a čas realizace výzkumu:

Práce bude probíhat v laboratořích CxI (budova L), laboratoř biotechnologií, a to v měsících prosinec až březen.

Vzorek:

Hodnoceným vzorkem budou bakteriální populace (například *Escherichia Coli* a *Micrococcus Luteus*), kde dané kmeny ne/budou vystaveny účinkům nanočástic poutaných k povrchovým strukturám.

Konzultant: Ing. Lucie Křiklavová, Ph.D.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

50 - 70 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury: viz příloha

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Michaela Jakubičková

Datum zadání bakalářské práce: 30. září 2014

Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2015



prof. Dr. Ing. Zdeněk Kůs  
rektor

L.S.



Mgr. Marie Froňková  
pověřena vedením ústavu

V Liberci dne 31. ledna 2015

# Příloha zadání bakalářské práce

## Seznam odborné literatury:

1. CAREY, Roberta. SCHUSTER, Mindy. MCGOWAN, Karin. Lékařská mikrobiologie v klinických případech. 1.vyd. Praha: Triton, 2011. 321 s. ISBN 978-80-7387-480-3
2. PHARMA-REPORTS. Klinicky významné bakterie. 1. Vyd. Praha: Triton, 2012. 123 s. ISBN 978-80-7387-588-6
3. RULÍK, M. a kol. Mikrobiální biofilmy. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. 447 s. ISBN 978-80-244-2747-8
4. ALENIUS, H., CATALÁN, J., LINDBERG, H., NORPPA, H., PALOMÄKI, J., & SAVOLAINEN, K. (2014). Chapter 3 - Nanomaterials a 5. JOMINI, S., LABILLE, J., BAUDA, P., & PAGNOUT, C. (2012). Modifications of the bacterial reverse mutation test reveals mutagenicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and byproducts from a sunscreen TiO<sub>2</sub>-based nanocomposite. *Toxicology Letters*, 215(1), 54-61. doi:10.1016/j.toxlet.2012.09.012
6. KUNZMANN, A., ANDERSSON, B., THURNHERR, T., KRUG, H., SCHEYNIUS, A., & FADEEL, B. (2011). Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1810(3), 361-373. doi:10.1016/j.bbagen.2010.04.007
7. LI, Q., MAHENDRA, S., LYON, D. Y., BRUNET, L., LIGA, M. V., LI, D., & ALVAREZ, P. J. J. (2008). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research*, 42(18), 4591-4602. doi:10.1016/j.watres.2008.08.015
8. LI, Y.-S., & CHURCH, J. S. (2014). Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), 29-48. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.003
9. LV, X., WANG, P., BAI, R., CONG, Y., SUO, S., REN, X., & CHEN, C. (2014). Inhibitory effect of silver nanomaterials on transmissible virus-induced host cell infections. *Biomaterials*, 35(13), 4195-4203. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.01.054
10. NJUGUNA, J., ANSARI, F., SACHSE, S., ZHU, H., & RODRIGUEZ, V. M. (2014). 1 - Nanomaterials, nanofillers, and nano 11. QIU, J., ZHANG, S., & ZHAO, H. (2011). Recent applications of TiO<sub>2</sub> nanomaterials in chemical sensing in aqueous media. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 160(1), 875-890. doi:10.1016/j.snb.2011.08.077
12. WANG, Y., WESTERHOFF, P., & HRISTOVSKI, K. D. (2012). Fate and biological effects of silver, titanium dioxide, and C60 (fullerene) nanomaterials during simulated wastewater treatment processes. *Journal of Hazardous Materials*, 201-202, 16-22. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.10.086
13. ZHANG, X.-Q., XU, X., BERTRAND, N., PRIDGEN, E., SWAMI, A., & FAROKHZAD, O. C. (2012). Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(13), 1363-1384. doi:10.1016/j.addr.2012.08.005





Studentka  
**Eva TULÁČKOVÁ**  
Z12000021  
Na Poříčí 112/13  
460 01 LIBEREC 1

Vyřizuje: Zuzana Janošíková / 485 353 762

V Liberci dne 9. července 2015  
č.j.: 15/8515/025494-02

**Vyjádření k žádosti o ponechání tématu a prodloužení termínu odevzdání bakalářské práce**

Vážená studentko,

na základě Vaší žádosti ze dne 30. 6. 2015, zaevidované pod č.j.: 15/8515/025494-01, Vám sděluji, že **souhlasím** s ponecháním tématu bakalářské práce „Analýza nanomateriálů a jejich interakce s bakteriálními populacemi“ a prodloužením termínu odevzdání do 30. 4. 2016.

S pozdravem

Mgr. Marie Froňková  
pověřena vedením ústavu

Technická univerzita v Liberci  
Ústav zdravotnických studií  
Studentská 2, 461 17 Liberec 1



Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

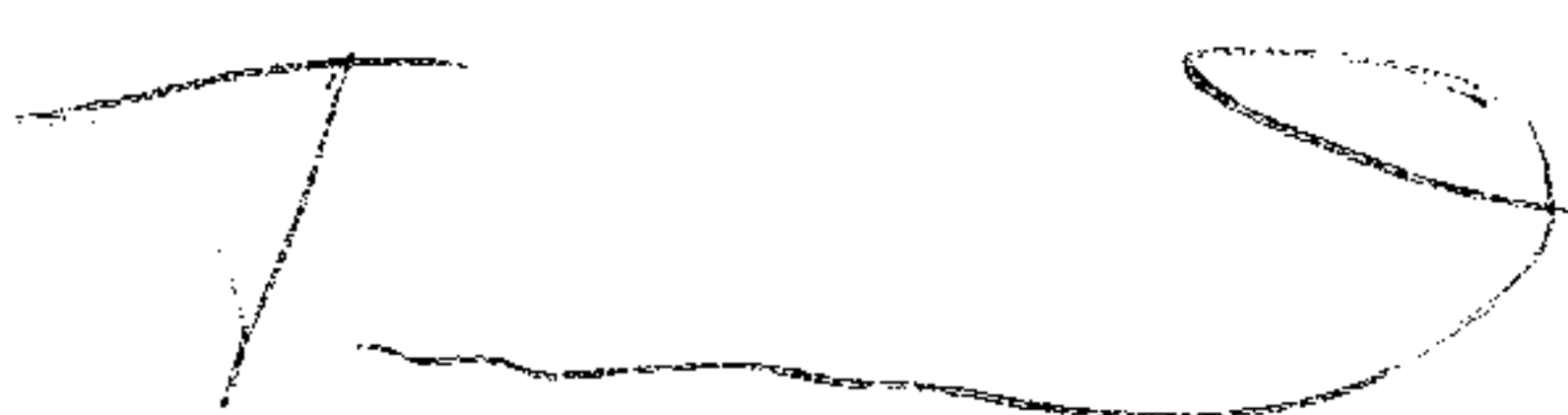
Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 02.12.2015

Podpis:

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'T' followed by a long horizontal stroke and a large loop at the end.



## **Abstrakt**

Bakalářská práce se zaměřuje na nalezení vhodných technik k inhibici buněk mikroorganismů aplikací nanočástic na povrchy, kde je nutné zachovat vysoce sterilní prostředí. Cílem této práce je prověření hypotéz vlivu nanočástic oxidu titaničitého na bakteriální populace *E. coli*. Rešerše byla věnována odborným článkům, které se zabývaly tématem fotokatalýzy oxidu titaničitého. V práci byl zkoumán nanokompozit (oxid titaničitý/oxid křemičitý), který byl nanesen metodou Dip coating na testovací sklíčko. Fotoaktivní film a obyčejné sklíčko byly ověřovány v prostředí osvětleném UV světlem a ve tmě. Pro hodnocení interakce povrchů s oxidem titaničitým a *E. coli* byla použita norma ISO 27447 a statistická metoda Jednofaktoriální ANOVA. Dále byla zjišťována respirační aktivita bakterií a ukazatel Live/Dead. Výsledky experimentů potvrdily, že povrch fotoaktivní vrstvy potřebuje pro svoji funkčnost UVA záření.

## **Klíčová slova**

*E. coli*, denní světlo, fotokatalýza, nanočástice, oxid titaničitý

## **Abstract**

This bachelor thesis is focused on finding appropriate methodologies to inhibit cells by applying nanoparticles on surfaces where it is necessary to maintain a highly sterile environment. The aim of this work is to examine hypotheses concerning the impact of nanoparticles of titanium dioxide on bacterial populations *E. coli*. The research followed scientific articles focused on titanium dioxide photocatalysis topic. In this work, we have studied the nanocomposite (titanium dioxide/silicon dioxide) mounted on a plain slide using Dip coating method. The photoactive film and the plain slide were tested in UV light and dark environments. To evaluate the interaction with the titanium dioxide surfaces and the *E. coli* we used the standard ISO 27447 norm and Analysis of variance. Furthermore, the bacteria were tested for respiratory activity and Live/Dead. The experimental results confirmed that the surface of the photoactive layer needs for its functionality UVA radiation.

## **Keywords**

*E. coli*, daylight, photocatalysis, nanoparticles, titanium dioxide

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat Ing. Michaele Jakubičkové za vedení mé bakalářské práce, cenné rady a odborný dohled, trpělivost a ochotu. Děkuji také konzultantce Ing. Lucii Křiklavové, Ph.D. za odborný dohled a laskavou komunikaci a Bc. Alici Břečkové, Mgr. Petře Škodové a studentce Adéle Coufalové za asistenci v laboratoři.

Velké poděkování náleží celé mé rodině, přáteli a především svému bratru Mgr. Michalu Tuláčkovi za podporu, trpělivost a povzbuzování po dobu mého studia a jeho snoubence Bc. Martině Mandové za kontrolu anglického jazyka.

## Seznam zkratek

ANOVA	Analýza rozptylu
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
E. coli	Escherichia coli
G-	gramnegativní
G+	grampozitivní
H1	alternativní hypotéza
H <sub>0</sub>	nulová hypotéza
ICP OES	Optická emisní spektrometrie
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
NB	Nutrient Broth
PET	polyethylentereftalát
UV	ultrafialové záření
UV BLB	zářivka s černým sklem, vyzařující ultrafialové záření
ΔR	antibakteriální účinnost po UV ozáření, s přihlédnutím na tmu
RL	antibakteriální činnost po UV ozáření
Bl	průměrná hodnota kontrolních vzorků, poté co byly ozářeny
Cl	průměrná hodnota vzorků s fotoaktivní vrstvou, poté co byly ozářeny
Bd	průměrná hodnota kontrolních vzorků, poté co byly v temnu
Cd	průměrná hodnota vzorků s fotoaktivní vrstvou, poté co byly v temnu
tab.	tabulka
obr.	obrázek

# Obsah

<b>I</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>15</b>
<b>II</b>	<b>Teoretická část.....</b>	<b>17</b>
1	<i>Nanočástice .....</i>	<i>17</i>
1.1	Biomedicínské aplikace .....	17
2	<i>Fotokatalýza .....</i>	<i>18</i>
2.1	Katalyzátor .....	18
2.2	Fotokatalýza oxidu titaničitého .....	19
2.3	Ultrafialové záření .....	19
3	<i>Oxid titaničitý .....</i>	<i>21</i>
3.1	Rutil .....	21
3.2	Anatas .....	21
3.3	Brookit .....	21
3.4	Vlastnosti oxidu titaničitého .....	22
3.5	Využití oxidu titaničitého.....	22
3.6	Vrstvy oxidu titaničitého.....	22
3.7	Hybridní vrstvy .....	23
3.8	Metody nanášení vrstev .....	23
4	<i>Princip analytických metod .....</i>	<i>24</i>
4.1	Fluorescenční mikroskopie .....	24
4.2	Ultrafialovo-viditelná spektrometrie .....	24
4.3	Respirometrická metoda .....	25
4.4	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.....	25
5	<i>Principy testování fotokatalytických vrstev.....</i>	<i>26</i>
5.1	Metoda testování antibakteriální aktivity materiálů polovodičových fotokatalyzátorů podle normy ISO 27447: 2009.....	26
5.2	Jednofaktoriální analýza rozptylu .....	27
6	<i>Bakterie používané k testování antibakteriální aktivity podle normy ISO 27447 .....</i>	<i>29</i>
6.1	Gramovo barvení .....	29
6.2	Vliv ultrafialového záření na bakteriální buňku.....	30
6.3	Biofilm .....	30
6.4	Escherichia coli .....	30
6.5	Staphylococcus aureus .....	31
6.6	Klebsiella pneumoniae .....	31
<b>III</b>	<b>Výzkumná část .....</b>	<b>32</b>
1	<i>Cíle a výzkumné předpoklady:.....</i>	<i>32</i>
2	<i>Materiály a metody.....</i>	<i>32</i>
2.1	Přístroje.....	32
2.2	Software .....	36
2.3	Bakterie.....	36
2.4	Pevné půdy pro kultivaci bakterií .....	37
2.5	Příprava vzorku před testováním .....	39
3	<i>Metodika výzkumu .....</i>	<i>41</i>
3.1	Hodnocení respirační aktivity .....	41
3.2	Metoda Live/Dead® BacLight™ .....	42
3.3	Stanovení antibakteriální aktivity materiálů polovodičových fotokatalyzátorů, ISO 27447 .....	42
4	<i>Analýza výzkumných dat .....</i>	<i>44</i>

4.1	Hodnocení respirační aktivity .....	45
4.2	Metoda Live/Dead .....	46
4.3	Stanovení antibakteriální aktivity materiálů polovodičových fotokatalyzátorů, ISO 27447 .....	46
4.4	Charakteristika povrchu fotoaktivního filmu .....	52
4.5	Analýza louhování oxidu titaničitého .....	54
5	<i>Analýza výzkumných cílů a předpokladů</i> .....	54
6	<i>Diskuze</i> .....	55
7	<i>Návrh doporučení pro praxi</i> .....	56
<b>IV</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>57</b>
<b>V</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>58</b>



# I Úvod

Znečištěné ovzduší je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících kvalitu života lidí na Zemi. Již v minulosti člověk vytápěl svá obydlí, vypaloval lesy a taval rudu. Ve větší míře se tento problém začíná projevovat zejména se zahájením průmyslové revoluce v 18. století. Dále akceleroval s rozvojem průmyslové výroby a dopravy, když se převládajícím zdrojem energie stalo spalování uhlí. Velkokapacitní těžbou se snížila jeho cena a zvýšila dostupnost pro obyvatelstvo. Tím také došlo k masovému rozšíření lokálních, málo účinných topenišť, produkujících oxid uhličitý, který značně poškozuje životní prostředí, zejména u větších sídelních celků. Masový rozvoj automobilové dopravy ve 20. století tuto situaci dále zhoršoval.

Jednou z moderních možností, jak vzniklou situaci řešit, je využití fotokatalyckého jevu. Ve vývoji fotokatalýzy se do popředí zařadilo Japonsko, v důsledku průlomového objevu profesora Akira Fujishimi, který v roce 1967 popsal Fujishimův jev ve své disertační práci. Fotokatalýza je proces samovolného rozkladu nečistot, jako jsou prachové částice, plísňe, viry, bakterie a jiné, za působení katalyzátoru a světelného záření. Mezi nejběžněji užívaný fotokatalyzátor, který ovlivňuje urychlení chemické reakce, patří oxid titaničitý. Hlavním důvodem je jeho netoxicity a výjimečná chemická stálost.

Proces fotokatalýzy lze využít aplikací nánosu fotoaktivních vrstev oxidu titaničitého na povrchy. Toto opatření umožňuje výrazně zredukovat organické nečistoty z okolí, včetně bakterií a virů, a tím zlepšit životní prostředí zejména v místech, kde navzájem přichází do styku větší množství lidí, jako jsou úřady, kulturní domy, knihovny a další. Značné rozšíření by bylo žádoucí především ve zdravotnických zařízeních, kde je sterilita základním předpokladem pro zamezení šíření nemocí a úspěšnou léčbu pacientů. Využít by však šlo i v exteriérech, jako jsou obytné zóny, pozemní komunikace, tunely, nebo průmyslové objekty.

Hlavním výzkumným předmětem práce bylo hodnocení aplikace nanočástic oxidu titaničitého na povrchové struktury, s cílem posouzení inhibice bakteriální

populace *E. coli*. Dosažené výsledky, které byly změřeny v laboratoři, byly porovnány s odbornou literaturou.

V teoretické rešerši byla zpracována následující témata: katalýza, oxid titaničitý, bakterie používané pro antibakteriální testování a metody testování. Praktická část je zaměřená na analýzu antibakteriální aktivity oxidu titaničitého podle normy ISO 27447. V experimentech byla použita bakteriální populace *Escherichia coli*. V závěru práce bylo provedeno zhodnocení testovaných metod.

## **II Teoretická část**

### **1 Nanočástice**

Obor nanotechnologie se věnuje nanomateriálům, což jsou materiály obsahující nanočástice, jejichž rozměr dosahuje velikosti do 100 nm. Vzhledem k široké škále využití mají nanočástice velký potenciál uplatnění například v potravinářském průmyslu (např. nutriční doplňkové látky, silnější arómata, barviva, antibakteriální přísady v obalech potravin) či v zemědělských aplikacích (např. nano-krmiva pro kuřata). Integrace nanomateriálů s biologií vedla k vývoji diagnostických a terapeutických přístrojů, kontrastních látek, aplikací fyzikální terapie a dalších. [1]

#### **1.1 Biomedicínské aplikace**

Široké veřejnosti jsou známé komerčně úspěšné ponožky s nanočásticemi stříbra, které mají antibakteriální účinek a chrání proti pachu. Dále jsou v širokém povědomí nanočástice oxidu titaničitého, které se nanášejí na dlaždice, čímž se zaručuje hydrofóbnost, protože se kvůli specifickým vlastnostem na povrchu neusazují kapičky. I další sloučeniny lze využívat ve formě nanočástic, například železo v této formě napomáhá k čištění vody a oxid ceričitý ke snížení spotřeby pohonné hmoty. Velkou budoucnost nalézají v medicíně, protože vývoj směřuje k léčbě nádorů nebo rozvoji moderních zobrazovacích metod. [2, 3] Antimikrobiální vlastnosti sloučeniny stříbra a stříbrných iontů jsou historicky uznávané a používány v širokém rozsahu aplikací od dezinfekce zdravotnických prostředků až po domácí spotřebiče na úpravu vody. Nicméně, mechanismus toxicity stříbra je stále částečně nezodpovězenou otázkou. [4] Kromě toho bylo v in vitro studiích prokázáno, že kulovité nanočástice stříbra mohou být použity jako antivirová činidla v lidské imunoterapii. [5] V nedávných studiích bylo upozorněno, že nanočástice oxidu železitého mohou být použity k tepelné destrukci nádorů. Lokálně akumulované nanočástice umožňují tkáňovou specifickou hypertermii, která se přednostně zaměřuje na nádorovou tkáň a zároveň šetří normální tkáň. Dalším velmi využívaným nanomateriálem je zlato, které má široké uplatnění v mnoha různých

aplikacích. Zlato se používá k udržení stability a rozlišovací schopnosti barevných fotek, protože mimo jiné vyniká velmi dobrými katalytickými účinky. V biomedicíně slouží soli zlata k léčbě revmatoidní artritidy, i když mechanismus účinku je stále předmětem diskuze. [6] Cílené terapeutické nanočástice, pojmenované BIND-014, mají slibné výsledky v probíhající klinické studii. Nanočástice se akumulují více v nádorech než ve zdravé buňce.[7]

Obor nanotechnologie je relativně novým odvětvím vědy. V současné době jsou kvůli možným účinkům na lidské zdraví podněcovány výzkumné studie (zejména na genotoxicitu). U mnoha nanočástic bylo zjištěno, že jsou příčinou chromozomální aberace, DNA zlomů, oxidativního poškození DNA a následné genetické mutace. [8] Rizika nastávají v případě nekontrolovatelného vniku částic do buněk, protože nanočástice mohou penetrovat jádro a způsobit poškození DNA. Při vdechnutí nanočástic do plic se materiál neodvratně naváže v plicních sklípcích a je schopen způsobit zánět a poškození alveolů. [9]

## 2 Fotokatalýza

Pojem fotokatalýza lze etymologicky rozložit na dvě slova:

- **foto** světelné záření
- **katalýza** chemická reakce

Fotochemické procesy (oxidačně-redukční) probíhají na povrchu polovodiče. Fotokatalýza spočívá ve vzájemném působení katalyzátoru a světla, při kterém dochází k rozkladu cizorodých látek. [10] Oxid titaničitý společně s UV zářením využívá heterogenní katalýzu, protože reakce probíhá ve dvou fázích.[11]

### 2.1 Katalyzátor

Katalyzátory ovlivňují rychlost chemické reakce, tím že snižují aktivační bariéru (k reakci je zapotřebí menší energie). Tato látka zůstává po skončení chemické reakce v

původním složení. Mezi významné katalyzátory patří kovy nebo jejich oxidy.[12] Katalyzátorem ale mohou být i jiné látky, v lidském těle jde například o enzymy.

### **2.1.1 Heterogenní katalyzátor**

U homogenní katalýzy jsou katalyzátor i reagující látka ve stejné fázi. Naopak u heterogenní katalýzy probíhají reakce v různých fázích (polovodič a světlo). Katalýza se rozděluje do více kroků:

- v prvním kroku se adsorbuje molekula, při které vznikne adsorbované teplo,
- v druhém kroku proběhne reakce s aktivační energií pro danou reakci,
- v třetím kroku nastane desorpce produktu, která spotřebuje teplo. [13]

Oxid titaničitý působí v přítomnosti UVA záření jako fotokatalyzátor. Foton dopadající na povrch katalyzátoru excituje elektron z valenčního pásu do vodivostního, čímž vzniká ve valenčním pásu kladně nabitá díra. Takto vzniklé náboje mohou spustit oxidačně redukční reakce na povrchu katalyzátoru. [14]

## **2.2 Fotokatalýza oxidu titaničitého**

Oxid titaničitý je polovodič, který je aktivován světelným zářením. V polovodičích jsou energetické hladiny uspořádány do elektrických pásů. (viz Obrázek 13). Dolní pás je valenční, horní pás je vodivostní. Mezi těmito pásy je zakázaný pás. Šířka zakázaného pásu rozděluje látky podle elektrické vodivosti [14]

Šířka zakázaného pásu oxidu titaničitého je 3,2 eV. Proto je ke vzniku fotokatalytické reakce na jeho povrchu zapotřebí záření s vlnovou délkou 365 nm, což odpovídá UVA záření. Při oxidačně-redukčních reakcích organických látek pak v ideálním případě vzniká oxid uhličitý a voda (viz Obrázek 14). [14]

## **2.3 Ultrafialové záření**

Ultrafialové záření (ultra-violet, UV) je elektromagnetické záření, které se v elektromagnetickém spektru nalézá mezi viditelným a rentgenovým zářením (viz Obrázek 15). Rozsah vlnových délek UV záření je 100 až 400 nm, což je méně než

u viditelného záření. [15] Podle vlnové délky světla lze dále rozlišovat tři typy UV záření, a sice UVA, UVB a UVC. [16]

Světelné paprsky Slunce nemohou dorazit v celém spektru na planetu Zemi, protože vlivem různých atmosférických vrstev, jako je např. ozonová vrstva nebo stratosféra, se část záření absorbuje. [15] Na povrch ze slunečního záření dopadá největší množství UVA (cca 90 až 99 %) a menší množství UVB, které se z velké části absorbuje v ozónové vrstvě, přičemž na povrch dopadá pouze 1 až 10 %. Naproti tomu UVC na zemský povrch nedopadá. [16]

- **Ultrafialové záření (A) - 400 až 320 nm**

Toto záření prostupuje do škáry (vazivová vrstva kůže pod pokožkou). Pozitivního vlivu záření se využívá pro léčbu lupenky (světloléčba). Naopak jeho negativním účinkem je to, že přispívá ke zrychlení stárnutí kůže, vzniku vrásek, strupovatění kůže a riziku vzniku kožního melanomu. UVA záření se používá do UV trubic v soláriu. [16]

- **Ultrafialové záření (B) - 320 až 280 nm**

Záření proniká do epidermis a napomáhá k opožděnému zhnědnutí kůže. Negativně působí UVB záření na DNA buňky, zde může vyvolat imunitní potlačení. Paprsky s menší vlnovou délkou jak 300 nm mají bakteriocidní účinky, a proto se převážně používají v germicidních lampách v laboratořích. [16]

- **Ultrafialové záření (C) - 280 až 100 nm**

Záření se vyskytuje v ionosféře a ionizuje ovzduší, čímž se tvoří ozón. Nejproduktivněji vzniká ozón při UV záření, které má vlnovou délku 200 nm. Ozón může mít neblahý vliv na lidské zdraví při narušení ozónové vrstvy. Do tkání proniká v menší míře. Častým místem reakce je ale spojivka. [16]



### **3 Oxid titaničitý**

Oxid titaničitý je nejrozšířenější sloučeninou titanu. V přírodě se vyskytuje ve třech formách: anatas, rutil a brookit. Tyto minerály jsou polymorfní, což znamená, že se nemění jejich složení, ale odlišují se ve své struktuře. Jejich zabarvení se mění s příměsí různých kovů (např. železo). [14] Fotokatalytické vlastnosti oxidu titaničitého byly využity v různých environmentálních aplikacích k odstranění znečišťujících látek z vod a ovzduší. [5]

#### **3.1 Rutil**

Rutil je ve srovnání s ostatními nerosty primární minerál. Organizace molekul rutilu je charakterizována tetragonální krystalickou strukturou (viz Obrázek 16). Rutil se vytváří působením vysokých teplot, takzvanou kalcinací, čímž vznikne jemný prášek. Typický barevný odstín bývá v rozmezí mezi červenou až černou, ale může mít i zlatavou barvu. Kromě toho mohou být krystaly místy i průsvitné. [14] Šířka zakázaného pásu je 3,0 eV. [17]

#### **3.2 Anatas**

Anatas má rovněž tetragonální strukturu (viz Obrázek 16) při nízkých teplotách. Minerál je schopen absorbovat fotony UV světla s vlnovou délkou větší než 390 nm a má šířku zakázaného pásu 3,2 eV. Zajímavou vlastností je jeho změna v rutil při vysokých teplotách (okolo 915 °C). [14]

#### **3.3 Brookit**

Brookit není moc využíván a má na rozdíl od ostatních minerálů odlišnou (ortorombickou) strukturu. Zabarvení nerostu je tmavě hnědé až zelenočerné. Je stabilní při nízkých teplotách, a při vysoké teplotě se jeho struktura (okolo 750 °C) mění na rutil podobně jako u anatasu. Šířka zakázaného pásu je 3,3 eV. [14]

### 3.4 Vlastnosti oxidu titaničitého

- Mechanická odolnost (vůči klimatickým podmínkám)
- Chemická stabilita (tvar oxidu zůstává po chemické reakci v původním stavu)
- Foto-stabilita (ve viditelné a infračervené oblasti)
- Optické vlastnosti (vysoká transparentnost, velký index lomu)
- Netoxický (nevytváří škodlivé vedlejší produkty)

Oxid titaničitý je vzhledem ke svým specifickým vlastnostem vhodný pro širokou škálu využití, protože je netoxický, ekonomicky přijatelný, stabilní a foto-aktivní. [14]

### 3.5 Využití oxidu titaničitého

Oxid titaničitý má v komerčních technologiích velmi důležité zastoupení. Vyskytuje se jako minerál s optickými a elektrickými vlastnostmi, které jsou vhodné pro řadu aplikací v oblasti foto-voltaiky a senzorů. Dále se používá jako bílý pigment, neboť má se svou výraznou bělostí velké uplatnění ve stavebnictví nebo v kosmetickém a potravinářském průmyslu. [14] Popularita nanočástic oxidu titaničitého roste s rozvojem fotokatalyzátorů, protože při začlenění nanočástic do dlaždic pomáhá samočistit povrchy, a to především ve veřejných prostorách (školy, úřady a jiné). [17]

### 3.6 Vrstvy oxidu titaničitého

Pomocí vrstev oxidu titaničitého lze vytvořit průhledný, dobře adhezni povlak. Není však vhodný pro aplikaci na PET lahve, ale pouze na (borosilikátové) sklo, protože musí vydržet vysoké teploty do 600 °C. Bylo zjištěno, že se zlepšuje přilnavost povrchu, pokud se zahřeje na 450 °C. Tato metoda není univerzální způsob nanášení, protože pouze část prekurzorů je vhodná k tepelnému zpracování. [18]

### 3.7 Hybridní vrstvy

Při fotokatalýze se z důvodu velmi dobrých vlastností využívají hybridní vrstvy oxidu titaničitého. Bylo prokázáno, že oxid titaničitý má malou mechanickou odolnost. Po přidání oxidu křemičitého se zlepšila mechanická stabilita materiálu, omezilo se šíření titaničitých zrn a pozitivně se zlepšila adheze. Oxid křemičitý má dále prokazatelný vliv absorpce na povrchu materiálu a chová se jako absorbent. V blízkosti vrstvy takzvaně zvyšuje koncentraci organických nečistot, a tím i zvyšuje rychlost fotokatalýzy. [19]

Povrch se reguluje hmotnostním poměrem (oxid titaničitý - oxid křemičitý). Pokud je zvýšené množství oxidu titaničitého, pak se shlukuje. Pokud je zvýšené množství oxidu křemičitého, pak se izoluje a oxid titaničitý se naváže na oxid křemičitý. Optimální vrstva je titan-kyslík-křemík, přičemž povrch je hydrofilní. [19]

### 3.8 Metody nanášení vrstev

Oxid titaničitý využíváme v práškové formě nebo pevně uchycený na substrát. K nanesení pevně uchyceného filmu na nečinný nosič lze využít různé techniky. Vrstvy se na povrch nanášejí různými metodami, jako je například Dip coating. [20]

#### 3.8.1 Dip coating

Metoda se řadí mezi namáčecí techniky (viz Obrázek 17). Dip coating se skládá z několika kroků: ponoření, vynoření a zgelovatění. Nejprve se skleněný substrát ponoří do roztoku. Poté je substrát vytažen přesně danou rychlostí. Konečnou fází procesu je zgelovatění, kdy se odpařuje rozpouštědlo z povrchu substrátu a na povrchu se vytvoří vrstva oxidu titaničitého. Tloušťka vrstvy je přibližně 20 nm až 50  $\mu\text{m}$ . Tloušťka vrstvy je ovlivněna rychlostí a úhlem vytahování a viskozitou roztoku. [20]

## **4 Princip analytických metod**

V této části budou podrobněji představeny jednotlivé analytické metody a jejich princip.

### **4.1 Fluorescenční mikroskopie**

Při fluorescenční mikroskopii se pro pozorování bakteriální buňky využívá luminiscence neboli spontánní záření vybuzených molekul. V případě, že jsou molekuly vybuzeny fotony UV nebo viditelného světla, nazývá se tento jev jako fotoluminiscence. Tento jev se dále rozděluje do dvou kategorií (fluorescence, fosforescence), v závislosti na elektronové konfiguraci excitovaného stavu a emisní dráze. [21]

#### **4.1.1 Fluorescenční jev**

Fotony dopadají na molekulu fluorescenčního barviva (fluorofor, fluorochrom). Elektron absorbuje energii a je excitován do vyšší energetické hladiny (viz Obrázek 18). Tento stav není stabilní a elektron se po čase přesouvá zpět na nižší energetickou hladinu, čímž se část jeho energie vyzáří v podobě tepla. Proto má foton méně energie a vlnová délka emitovaného světla je delší než v případě světla excitovaného. [22]

#### **4.1.2 Fluorescenční barvení**

Fluorescenční barvení se používá ke zviditelnění molekul a buněk, které nemají vlastnost auto-fluorescence. Barvicí látka se naváže na buněčné struktury (např. DNA) a na protilátku bílkovin přítomnou v cytoplazmě. Barvivo ve své molekule obsahuje reaktivní skupinu, která je schopna reagovat s nukleofilními skupinami. Touto metodou lze zviditelnit cytoskelet, chromatin a membránové bílkoviny. [21, 23]

### **4.2 Ultrafialovo-viditelná spektrometrie**

Princip ultrafialovo-viditelné spektrometrie je založen na Lambert-Beerově zákoně, který stanoví závislost tloušťky, absorpce a koncentrace látky. Metoda spočívá

v průchodu toku záření o určité vlnové délce skrz kyvetu s testovaným vzorkem. Při dopadu záření se část tohoto záření absorbuje, část rozptýlí a část odrazí. [14]

### **4.3 Respirometrická metoda**

Respirometrická metoda spočívá v periodickém monitorování systému s uzavřeným okruhem. Monitoruje se koncentrace plynu z materiálu, čímž se analyzuje mikrobiální dýchání. Měřicí přístroj udává přírůstek a spotřebu plynu a používá několik typů snímačů. [24]

Koncentrace kyslíku se měří paramagnetickým senzorem, neboť kyslík vykazuje poměrně unikátní chování v magnetickém poli. Vzorek plynu prochází okolo tyčinky a paramagnetické vlastnosti tlačí kyslík na tyčinku, což způsobuje, že se tyčinka otáčí. Otáčení tyčinky je přímo úměrné koncentraci kyslíku v plynu (čím více je přítomno kyslíku, tím větší je rotace). [24]

### **4.4 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem**

Optická emisní spektrometrie je analytická metoda, která stanovuje koncentrace jednotlivých prvků ze vzorku. Tento přístroj umožňuje analyzovat téměř všechny prvky periodické tabulky (80 %). Roztok vzorku je zmlžen a vzniklá mlha je proudem argonu vedena do hořáku. Vzhledem k vysoké teplotě plazmy se rozpouštědlo okamžitě odpaří, čímž zanikají chemické vazby v molekulách přítomných sloučenin a elektrony se excitují do vyšších energetických hladin. Tento stav není stabilní a elektrony se vrací zpět na základní energetickou hladinu. Emitované světlo přechází do monochromátoru, kde se světelné záření rozdělí podle vlnových délek. Fotony rozděleného záření analyzuje detektor, který změní intenzitu dopadajícího záření na elektrický signál, který lze změřit. [25]

## **5 Principy testování fotokatalytických vrstev**

V této části budou podrobněji představeny jednotlivé metody, které testují fotokatalytické vrstvy.

### **5.1 Metoda testování antibakteriální aktivity materiálů polovodičových fotokatalyzátorů podle normy ISO 27447: 2009**

Norma stanovuje dvě metody testování, mezi které se řadí skleněná adhezní metoda a filmová adhezní metoda. Skleněná adhezní metoda se užívá pro tkaniny či textilie, protože je chrání před deformací. Tato metoda se užívá k analýze bakteriální populace *Staphylococcus aureus* a *Klebsiella pneumoniae*. Filmová adhezní metoda se používá u pevných materiálů, kde se analyzují s ní bakteriální populace *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. [26]

#### **5.1.1 Postup přípravy**

Na dno Petriho misky se umístí zvlhčený filtrační papír, na který se položí skleněné trubičky tak, aby sklíčko nepřišlo do kontaktu s vlhčeným papírem. Na trubičky se následně přiloží testovaný vzorek (viz Obrázek 19). [26]

#### **5.1.2 Filmová adhezní metoda**

Pro měření podle filmové adhezní metody musíme mít připravené inokulum s testovanou bakterií o koncentraci, která odpovídá prvnímu stupni Mc Farlandova zákalu. Na testovací vzorek se nanáší 0,15 ml bakteriální suspenze. [26]

#### **5.1.3 Zvolení intenzity ultrafialového záření**

Maximální intenzity záření se dosahuje za dne vedle okna ( $0,25 \text{ mW.cm}^{-2}$ ) nebo ve vzdálenosti 1,5 m od okna ( $0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$ ) při použití fluorescenční lampy. Minimální intenzity záření je naopak dosahováno v zatemněné místnosti bez oken, při užití pouze vnitřního světla ( $0,001 \text{ mW.cm}^{-2}$ ). [26]



#### 5.1.4 Vyhodnocení vzorků

Desetinásobné ředění bakteriální suspenze je zalito živnou pevnou půdou. Vzorky se vkládají do termostatu při teplotě 37 °C. Po uplynutí intervalu 24 – 48 hodin se vzorky počítají a vyhodnocují. [26]

#### 5.1.5 Vyhodnocení výsledků antibakteriální aktivity

Matematické vyhodnocení výsledků můžeme vyjádřit následovně:

- **RL:** fotokatalytická antibakteriální činnost po UV ozáření (intenzity L)
- **ΔR:** fotokatalytická antibakteriální účinnost po UV ozáření s přihlédnutím na počet inkubovaných bakterií ve tmě

$$\Delta R = \log \frac{B_l}{C_l} - \log \frac{B_d}{C_d}$$

$$RL = \log \frac{B_l}{C_l}$$

- $B_d$  Průměrná hodnota kontrolních vzorků, poté co byly v temnu.
- $C_d$  Průměrná hodnota vzorků s fotoaktivní vrstvou, poté co byly v temnu.
- $B_l$  Průměrná hodnota kontrolních vzorků, poté co byly vystaveny záření.
- $C_l$  Průměrná hodnota vzorků s fotoaktivní vrstvou, poté co byly vystaveny záření.

Výše uvedený výpočet je důležitý pro důkaz inhibice bakterií, ke které došlo za pomoci fotokatalýzy. [26]

## 5.2 Jednofaktoriální analýza rozptylu

Tato statistická metoda umožňuje zjistit, jestli na sobě závisí dva náhodné vektory. K tomu užijeme metodu “analýzy rozptylu”, která je označena též jako ANOVA (Analysis of variance). [27, 28, 29]

Testujeme nulovou hypotézu ( $H_0$ ), že se jednotlivé průměry rovnají. V případě že ano ( $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ ), jsou si skupiny navzájem podobné a nulová hypotéza se přijímá. V opačném případě nulovou hypotézu zamítáme, přijímáme alternativní hypotézu ( $H_1$ ), že se jednotlivé skupiny od sebe liší ( $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$ ). [27, 28, 29]

Jednofaktoriální analýza rozptylu pomocí průměrů dat zjišťuje závislost mezi více skupinami. K vyhodnocení se musí provést 6 kroků: mezitřídní součet čtverců, vnitřní součet čtverců, kritická hodnota, testovací kritérium, mezitřídní průměr čtverců a vnitřní průměr čtverců. [27, 28, 29]

Pro rozpoznání závislosti se počítá testovací kritérium a kritická hodnota. V případě, že hodnota testovacího kritéria bude větší než kritická hodnota, bude zamítnuta nulová hypotéza o shodě rozptylů a přijme se hypotéza, že se hodnoty liší. V opačném případě bude nulová hypotéza přijata, a lze říci, že jsou si hodnoty navzájem podobné. Jejich závislost tím bude potvrzena. [27, 28, 29]

Testovací kritérium se stanovuje pomocí mezitřídního průměru čtverců a vnitřního průměru čtverců, poměr těchto hodnot se spolu s kritickou hodnotou užívá k vyhodnocení nulové hypotézy. Pro určení kritické hodnoty porovnáváme hodnoty stupňů volnosti s tabulkou (95% kvantil F rozdělení, přičemž hladina spolehlivosti  $\alpha = 0,05$ ). Na místě čitatele je stupeň volnosti pro rozptyl průměrů ( $V_p$ ) a na místě jmenovatele je stupeň volnosti reziduálního rozptylu ( $V$ ). [27, 28, 29]

### 5.2.1 Mezitřídní součet čtverců

$$SS_{MEZ} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$$

### 5.2.2 Vnitřní součet čtverců

$$SS_{vni} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$$

### 5.2.3 Mezitřídní průměr čtverce

$$MSA = \frac{SS_{mez}}{k - 1}$$

### 5.2.4 Vnitřní průměr čtverce

$$MSB = \frac{SS_{vni}}{N - k}$$

### 5.2.5 Testovací kritérium

$$F = \frac{MSA}{MSB}$$

### 5.2.6 Kritická hodnota

$$F_{\text{krit}} = F_{\alpha} [V_p, V]$$

$$V_p = k-1$$

$$V = N-1$$

( $n_i$  = počet měření,  $x_{ij}$  = naměřená hodnota,  $\bar{x}_i$  = průměrná hodnota jednoho sloupce,  $\bar{x}$  = celková průměrná hodnota,  $k$  = počet tříd,  $N$  = (počet tříd x počet měření)) [27, 28, 29]

## 6 Bakterie používané k testování antibakteriální aktivity podle normy ISO 27447

Mikroorganismy jsou charakteristické prokaryontní buňkou (buňka *E. coli* viz Obrázek 20) a mají tedy jednodušší stavbu oproti buňce živočišné. Bakteriální buňky obsahují nukleoid, cytoplazmatickou membránu, buněčnou stěnu a ribozomy. Rozsah jejich velikostí je rozmanitý (od  $0,3 \times 0,3 \mu\text{m}$  až po  $25 \times 10 \mu\text{m}$ ). Nejčastějšími tvary jsou tyčinky, koky, dvojice, řetízky (např. streptokoky) či shluky (např. stafylokoky). [30]

### 6.1 Gramovo barvení

K rozlišení typu bakterií používáme metodu Gramova barvení. Rozdíly mezi typy bakterií vyplývají z odlišné stavby buněčné stěny. Princip metody spočívá v obarvení bakterií krystalovou violetí, která se posléze odbarvuje etanolem. Grampozitivní bakterie jsou po aplikaci barvení modrofialové. Naproti tomu gramnegativní bakterie jsou odbarvené, avšak tyto buňky je možné znovu obarvit (např. červeně). [30]

## **6.2 Vliv ultrafialového záření na bakteriální buňku**

UV záření způsobuje u bakteriální buňky poškození biologické funkce, což může vést až ke smrti mikroorganismu. Základním vnějším projevem usmrcené bakterie je, že ztratila schopnost se rozmnožovat. Na UV záření jsou nejvíce citlivé nukleonové kyseliny (maximální absorpce 260 nm) a bílkoviny (maximální absorpce 180 a 280 nm). U nukleových kyselin působením záření např. vznikají kovalentní vazby uvnitř molekuly či dojde k přetržení řetězce. [30]

## **6.3 Biofilm**

Bakterie rostoucí ve formě biofilmu způsobují celou řadu chronických, a vzhledem k jejich rezistenci i obtížně eliminovatelných infekcí. Mezi nejběžněji vyskytující se bakterie se řadí *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*. Pro biofilmové infekce je typické, že bývají mnohdy způsobeny mikroorganismy, které jsou součástí běžné mikroflóry. Biofilm se dále vytváří snadno na dlouhodobě zavedených katétrech, tracheálních cévkách a na umělých implantátech (např. umělé srdeční chlopně, kardiostimulátory, umělé kloubní náhrady a nitroděložní tělíka). [31]

## **6.4 Escherichia coli**

*Escherichia coli* je gramnegativní, fakultativně anaerobní, nesporulující bakterie (viz Obrázek 20). Za normálních podmínek má bakterie tvar tyčinky a dosahuje délky 2  $\mu\text{m}$  a tloušťky 0,5  $\mu\text{m}$ . Tato bakterie patří mezi bičíkovce a je tedy díky disponujícímu bičíku schopná pohybu. Bakterie se běžně nachází v zažívacím traktu a je hostiteli prospěšná, neboť mu dodává vitamín  $\text{K}_2$  a chrání jeho trávicí trakt před osídlením choroboplodnými bakteriemi. Mimo střevo je bakterie patogenní, jelikož způsobuje gastroenteritidy, močové infekce, novorozeneckou meningitidu nebo peritonitidu. [32, 33]

## **6.5 Staphylococcus aureus**

*Staphylococcus aureus* je grampozitivní kulovitá bakterie, která je v českém jazyce označována jako zlatý stafylokok. Bakterii objevil skotský chirurg Ogston v roce 1980, který bakterii izoloval z operačních hnisavých ran. Bakterie je jednou z pěti příčin nozokomiálních infekcí a vyskytuje se především na sliznici dýchacích cest a rukou. [32]

## **6.6 Klebsiella pneumoniae**

*Klebsiella pneumoniae* je gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie, vyskytující se běžně ve fyziologické flóře úst, na kůži a v zažívacím traktu. *Klebsiella pneumoniae* je po *E. coli* druhým nejčastějším původcem močových infekcí, především u starších pacientů a u pacientů s chronickými plicními chorobami. Vyvolává gastrointestinální potíže a atrofii nosní sliznice a je dále hlavním zdrojem infekce z fekálního znečištění. Většina infekcí se vyskytuje jako nozokomiální při pobytu v nemocnici. [32]

### **III Výzkumná část**

#### **1 Cíle a výzkumné předpoklady:**

- Seznámení se s problematikou nanomateriálů.
- Rešerše na dané téma interakce nanomateriálů v biologických aplikacích.
- Vyhodnocení bakteriální populace E. coli.
- Navržení vhodné metodiky k inhibici buněk za využití aplikace nanočástic na povrchy v prostředí, kde je nutné zachovat vysoce sterilní podmínky.
- Prověření hypotéz vlivu nanočástic na bakteriální populace.

#### **2 Materiály a metody**

K hodnocení antibakteriální aktivity byly uvedeny všechny použité přístroje, software, bakterie, kultivační půdy a testovací vzorky.

##### **2.1 Přístroje**

V této kapitole byly stručně popsány přístroje, které byly použity v praktické části.

###### **2.1.1 Autokláv - UNISTERI HP**

Parní sterilizátor, který sterilizuje roztoky, laboratorní nádobí a nástroje párou (134 °C/7 min) a je vhodný i pro vaření půd. Tlaková komora má objem 73 litrů, sterilizátor podporuje 20 sterilizačních programů.

###### **2.1.2 Diamantová pila - IsoMet 1000**

Diamantová pila se používá pro přesné řezání jakéhokoliv materiálu. Skládá se z mikrometru, goniometru, diamantového kotouče, přitlačného ramena a nálevky.



Vestavěným mikrometrem se měří a upevňuje vzorek, goniometrem se nastavuje požadovaný úhel.

Tabulka 1: IsoMet 1000

Technické parametry	
Motor	95 W, 220 V
Otáčky měnitelné	(0 až 950) otáček / minutu
Maximální rozměry vzorku	do 38,1 mm
Maximální délka vzorku	do 203 mm

### 2.1.3 Výrobek destilované vody - GORO MID 300

Přístroj vyrábí destilovanou vodu, kterou získává procesem reverzní osmózy. Reverzní osmóza zachycuje nízkomolekulární látky a naopak neklade odpor volnému průtoku rozpouštědla. Kvalita vody splňuje normu ČSN ISO 3696

### 2.1.4 Fluorescenční lampa - BLB UVA Philips

Lampa se vkládá do sterilního boxu a umísťuje se na laboratorní šroubovací stojan. Intenzita záření se měří UVX radiometrem. UV lampa je vybavena černým sklem, čímž se docílí toho, že lampa emituje pouze UV záření.

Tabulka 2: BLB UVA Philips

Technické parametry	
Výkon	50 W
Vlnová délka	(300 - 400) nm
Intenzita záření	0,1 mW.cm <sup>-2</sup>
Doba expozice	4 hodiny

### 2.1.5 Fluorescenční mikroskop - Carl Zeiss Axio Imager M2M

Fluorescenční mikroskop snímkuje pomocí odraženého světla a umožňuje zobrazit fluorescenčně zbarvené bakterie. Mikroskop je vybaven kamerou AxioCam iCc1, fluorescenční lampou Colibri II a zobrazovací jednotkou. Kromě toho se skládá

z fokusačního zrcadla, čoček, filtrů a systému přivádějící objektivem světlo o určité vlnové délce ke zkoumanému objektu.

### 2.1.6 Laboratorní digitální váha - KERN EWB 620-2M

Váha se používá k přesnému odvážení sypkého prášku na přípravu živných půd. Pro udržení spolehlivosti a správnosti údajů je nutné váhu kalibrovat před každým měřením, aby nedošlo k chybě. Laboratorní váha je schopna měřit s přesností setiny gramu, ovšem ověřená hodnota má přesnost na desetiny gramu.

### 2.1.7 Měřič ultrafialového záření - model UVX-36

Radiometr je vhodný pro měření ultrafialových dlouhých vln. V praxi se využívá jako nejefektivnější ukazatel životnosti lampy, posuzuje tedy kvalitu intenzity záření. Zapisovací port umožňuje kontinuální monitorování, rozsah přístroje je možné přepnout do tří módů:

- (0 až 20) mW.cm<sup>-2</sup>, (0 až 2000) μW.cm<sup>-2</sup>, (0 až 200) μW.cm<sup>-2</sup>

V experimentech byl použit první mód, přičemž kalibrační bod přístroje byl 365 nm v rozmezí (335 až 380) nm, což odpovídalo UVA záření.

Tabulka 3: UVX model UVX-36

Technické parametry	
Napájení	9 V baterie
Čtení	2,8/sekundu
Přesnost snímače	± 5 %

### 2.1.8 Respirometr - Columbus Instruments Micro-Oxymax

Respirometr snímá koncentraci plynu, který je obsažený v uzavřeném okruhu systému. Pravidelné snímání umožňuje vypočítat aktuální a kumulativní hodnoty spotřeby a produkce. V metodě byl použit ke stanovení mikrobiálního dýchání (respektive bakteriálního metabolismu).

Micro-Oxymax má práh snímání v blízkosti  $2 \cdot 10^{-7}$  litrů za hodinu a umožňuje využít až 80 komor. Přístroj je velmi flexibilní a citlivý při kombinaci s více plyny. Standardně se snímá: kyslík, oxid uhličitý, metan, oxid uhelnatý, sirovodík a vodík.

Tabulka 4: Columbus Instruments Micro-Oxymax

Technické parametry	
Spotřeba energie	200 W
Průtoková rychlost plynu (standard)	500 cm <sup>3</sup> /min
Rozsahy plynových senzorů (standard)	CO <sub>2</sub> : (0 - 0.9)%, O <sub>2</sub> : ( 19.3 - 21.5) %
Délka vzorkování	8 minut
Jednotky plynu	mg/hod.

### 2.1.9 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázanou vazbou iCAP 6500

Spektrometr funguje na principu využívání emise a následné detekce světelného záření iontových prvků přítomných ve vzorku. Přístroj analyzuje téměř veškeré stopové prvky. Zdrojem iontů je argonová lampa. Zkoumání vzorků funguje pomocí roztokové metody. V případě použití laserové sondy, je možná analýza aerosolu z pevného vzorku.

Tabulka 5: ICP OES

Technické parametry	
Registr spektra	(165 až 900) nm
Obsahuje	Monochromátor, 2 fotonásobiče
Stanovení prvků ve stopových koncentracích	> 0,2 ppm (částice na jeden milion)

### 2.1.10 Sušička/Sterilizátor - Chirana řada HS 62A

Přístroj vysouší nebo sterilizuje laboratorní nádoby pomocí vysokotlaké páry. Zahrnuje komoru o obsahu 60 litrů, která má cirkulaci s ventilátorem. Vysoušení se uskutečňuje při 130 °C na 30 minut, naopak sterilizace se vykonává při 170 °C na

30 minut. Maximální teplota přístroje dosahuje 200 °C. Před použitím přístroje se kontroluje hladina vody v nádrži.

#### 2.1.11 Termostat – INCUCELL

Přístroj slouží k inkubaci mikrobiologických kultur. Termostaty jsou variabilní svým objemem a teplotou s kterou pracují. Pro bakterii *E. coli* je pro inkubaci nejvhodnější teplota při 37 °C po dobu 48 hodin.

## 2.2 Software

- Matlab (The Mathworks, Inc.), s využitím knihovny Image Processing Toolbox
- Matlab, funkce: Anova1

## 2.3 Bakterie

K testování antibakteriální aktivity byla použita bakteriální populace *Escherichia coli*.

### 2.3.1 *Escherichia coli*

Kmen CCM 3954 *Escherichia coli* (Masarykova univerzita Brno – Česká sbírka mikroorganismů). Počáteční koncentrace bakterií byla  $3 \cdot 10^8$  buněk/ml.

### 2.3.2 Mc Farlandova zákalová stupnice

Mc Farlandova stupnice zadává pět stupňů zákalových řad, pomocí níž určujeme počet buněk/ml. V experimentální části byl využit první typ zákalové řady.

Tabulka 6: Určení koncentrace bakterií dle absorbance

Mc Farlandova stupnice	0,5	<b>1</b>	2	3	4
Absorbance	0,1	<b>0,257</b>	0,451	0,582	0,669

## 2.4 Pevné půdy pro kultivaci bakterií

V experimentech byla použita následující média: agar, sója, broth a fyziologický roztok. Jednotlivá média jsou dále podrobně popsána.

### 2.4.1 Nutrient Agar (kód: M001)

Používá se jako kultivační médium pro pěstování a udržení mikroorganismů. Agar je homogenní sypký prášek, který připomíná krémově žlutý, rosolovitý gel. Reakce v médiu probíhají optimálně ve vodném roztoku při 25 °C, jehož pH je  $7,4 \pm 0,2$ . Masový pepton společně s kvasničným a hovězím extraktem poskytují nezbytné sloučeniny dusíku, uhlíku, stopových prvků a vitamínů, které jsou důležité k výživě bakterií. Chlorid sodný slouží k udržení osmotické rovnováhy média. Inokulum *E. coli* připravené v agaru (50 až 100) buněk/ml bujně roste (70 %). Byl použit agar od výrobce HiMedia Laboratories.

Tabulka 7: kód: M001

	Složení (gram/litr)
Masový pepton	5
Chlorid sodný	5
Hovězí extrakt	1,5
Kvasniční extrakt	1,5
Agar	15

### 2.4.2 Soyabean Casein Digest Medium (kód: M011)

Médium se využívá pro kontrolu sterility a pro kultivaci mikroorganismů. Sója patří mezi velmi výživná média především kvůli sójovému peptonu, enzymatickému hydrolyzátu a hydrogen-fosforečnanu draselnému. Chlorid sodný udržuje osmotickou rovnováhu média. Inokulum *E. coli* připravené v sóje (50 až 100) buněk/ml bujně roste při optimálních podmínkách (30 až 35) °C během (18 až 24) hodin. Bylo použito médium od výrobce HiMedia Laboratories.

Tabulka 8: kód: M011

	Složení (gram/litr)
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	17
Sójový pepton	3
Chlorid sodný	3
Hydrogenfosforečnan draselný	2,5

### 2.4.3 Nutrient Broth (kód: M002)

Základní kultivační médium pro pěstování a udržení mikroorganismů. Používá se na výrobu inokula, k ředění bakteriální suspenze (1/500 NB) nebo k získání obvyklého počtu bakterií ( $6,7 \cdot 10^5$  až  $2,6 \cdot 10^6$ ) buněk/ml. Peptická digest ze zvířecí tkáně, kvasničný a hovězí extrakt poskytují nezbytné sloučeniny dusíku, uhlíku, stopových prvků a vitamínů, které jsou důležité k výživě bakterií. Chlorid sodný slouží k udržení osmotické rovnováhy média. Reakce média probíhají optimálně ve vodném roztoku při 25 °C, jehož pH je  $7,4 \pm 0,2$ . Inokulum *E. coli* připravené v Brothu (50 až 100) buněk/ml bujně roste. Byl použit broth od výrobce HiMedia Laboratories.

Tabulka 9: kód: M002

	Složení (gram/litr)
Peptická digest zvířecí tkáně	5
Chlorid sodný	5
Hovězí extrakt	1,5
Kvasničný extrakt	1,5

### 2.4.4 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok je bezbarvý a isotonický, protože má stejný osmotický tlak a identický počet částic. V jednom litru je obsaženo 8,5 gramů chloridu sodného, což odpovídá tomu, že je v 1 ml obsaženo 8,5 mg NaCl ( $\text{Na}^+ = 154$ ;  $\text{Cl}^- = 154$ ) mmol/l.

## **2.5 Příprava vzorku před testováním**

Před samotným měřením je nutná příprava laboratorního nádobí, testovacích sklíček, živných půd a inokula.

### **2.5.1 Příprava sklíček**

V experimentální části byly použity kontrolní a fotoaktivní vzorky. Fotoaktivním vzorkem bylo testovací sklíčko, na které byl nanesen prekurzor Cleanox metodou Dip coating (viz Kapitola II3.8.1). Kontrolním vzorkem bylo obyčejné testovací sklíčko.

Sklíčka byla nařezána diamantovou pilou IsoMet 1000. Do nálevky, která je umístěná pod diamantovou pilou, se nalilo požadované množství vody, což odpovídá zhruba 5 mm k ponoření pily. Všechna testovací sklíčka byla nařezána na rozměry (2,5 × 2,5) cm.

### **2.5.2 Inokulum *E. coli***

Kapsle *E. coli* (CCM 3954) byla rozpuštěna v tekutém živném médiu (NB) a byla kultivována při 37 °C po dobu (24-48) hodin. Posléze byla *E. coli* očkovaná mikrobiologickou kličkou na tuhé médium (PCA agar Biorad) a kultivována při 37 °C po dobu (24 – 48) hodin. Narostlé kolonie byly přeneseny mikrobiální kličkou do tekutého média (NB). Ve vzniklém inokulu byl proveden Mc Farlandův zákal č. 1, což odpovídá absorbanci = 0.257, pro dosažení příslušného počtu bakterií (bakterie/ml). S inokulem je ideální pracovat ihned po jeho přípravě.

### **2.5.3 Sterilizace**

Na sterilizaci byl použit sterilizátor Chirana (viz Obrázek 1). Laboratorní nádobí bylo vysterilizováno při 170 °C na 30 minut.



Obrázek 1: Sterilizátor Chirana řada HS 62A (Zdroj: autor).

#### 2.5.4 Příprava živných pūd

Média (viz příprava) byla vařena v autoklávu UNISTERI HP (viz Obrázek 2) při 121 °C po dobu 15 minut. Média poté byla zchlazena na 25 °C a skladována na temném a studeném místě.



Obrázek 2: Autokláv: UNISTERI HP (Zdroj: autor).

#### Příprava:

- **Fyziologický roztok:** (4,25 g NaCl a 0,5 l destilované vody)
- **Sója:** (7,5 g sóji a 250 ml destilované vody)
- **Živný agar:** (7 g agaru a 250 ml destilované vody)
- **Nutrient Broth:** (6,25 g brothu a 250 ml destilované vody)



### 3 Metodika výzkumu

V této části budou u jednotlivých metod podrobněji popsány postupy měření.

#### 3.1 Hodnocení respirační aktivity

Respirometrická metoda ověřuje metabolickou aktivitu bakteriální populace. Za užití přístroje Columbus Instruments Micro-Oxyma (viz Obrázek 3) se při ní vyhodnocuje koncentrace kyslíku, oxidu uhličitého a methanu. Vzorky byly připraveny dle normy ČSN EN ISO 9408, která stanovuje jakost vod, k vyhodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí a určení spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru.

Do Fischerovy reagenční lahve o objemu 100 ml bylo dávkováno 10 ml vzorku. Do vzorku byl vložen testovaný povrch s fotoaktivním nátěrem a obyčejné sklíčko (kontrola). Vzorky byly umístěny pod UV lampu a do tmy. Celý proces byl v průběhu 40 hodin měřen kontinuálně a v daných intervalech byly vyhodnocovány koncentrace plynů.

**Vzorek zahrnuje:** fyziologický roztok; bakteriální suspenzi *E. coli* ( $1MF = 0.267$ ); 2 g/l glukózy



Obrázek 3: Respirometr Columbus Instruments Micro-Oxyma (Zdroj: autor).

### **3.2 Metoda Live/Dead® BacLight™**

Metoda stanovuje životaschopnost bakterií s použitím fluorescenčního mikroskopu ZEISS Axio Imager.M2, díky níž lze snadným barevným rozbořem rozpoznávat a klasifikovat vitalitu bakteriálních populací. Metoda funguje na principu průniku fluorescenčního barviva přes cytoplazmu. Pomocí zbarvení buněčných populací se identifikuje případné narušení buněčné membránové integrity. Umírající buňka má zhoršenou celistvost membrány, označuje se za mrtvou a zbarví se červeně. Buňka s nenarušenou integritou je životaschopná a zbarví se zeleně.

Interakce vzorků a mikroorganismů byla uskutečněna pod UV lampou a ve tmě. Jako povrch byly využity fotoaktivní a kontrolní vzorky. Na každý vzorek byly naneseny 3 kapky (30  $\mu$ l) bakteriální suspenze *E. coli*.

Nejprve bylo provedeno nulté měření, při kterém vzorky na rozdíl od ostatních nebyly ani ve tmě, ani pod UV lampou. Z každého vzorku se z první kapky odebralo 5  $\mu$ l suspenze, která byla vzápětí smíchána s 3  $\mu$ l fluorescenčního barviva, a po dobu 15 minut byly vzorky uchovány v temnu. Posléze se provedla analýza Live/Dead fluorescenčním mikroskopem a spočítala se viabilita bakterií. Po uplynutí dané doby se u ostatních kapek postupovalo stejným způsobem po již přesně daných časových intervalech.

### **3.3 Stanovení antibakteriální aktivity materiálů polovodičových fotokatalyzátorů, ISO 27447**

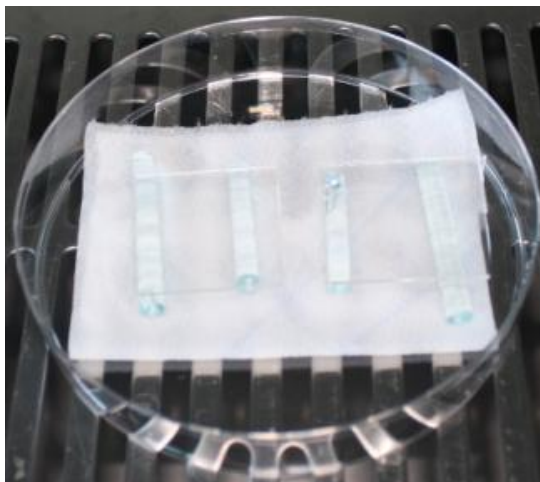
#### **3.3.1 Příprava metody**

Vzorky byly testovány ve tmě a pod UV lampou. UV lampa byla vložena do sterilního boxu a měla intenzitu záření 0,1 mW.cm<sup>-2</sup> (změřená vzdálenost činí přibližně 12,5 cm).

Do každé Petriho misky (viz Obrázek 4) se vložil na dno filtrační papír, který byl navlhčený destilovanou vodou. Na zvlhčený filtrační papír byly poskládány skleněné tyčinky, na které byl umístěn testovací vzorek. Na každý testovací vzorek bylo

naneseno 150  $\mu$ l bakteriální populace E. coli a suspenze byla rovnoměrně rozprostřena po celém vzorku sterilní skleněnou hokejkou.

Celkem bylo připraveno pět Petriho misek. Tři kontrolní a dva fotoaktivní vzorky. Měření bylo provedeno duplicitně.



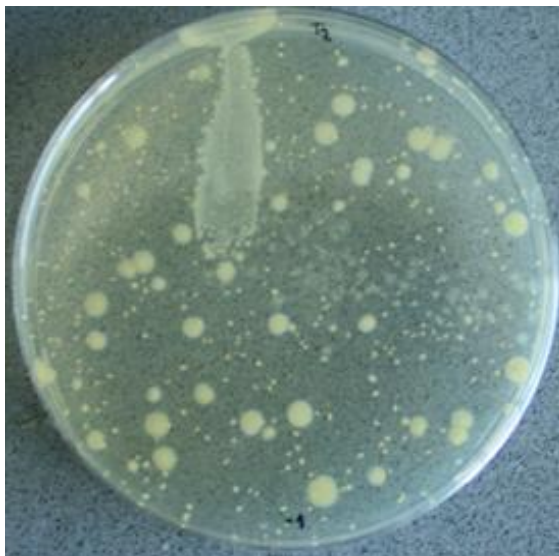
Obrázek 4: Schéma přípravy metody (ISO 27447). Na obrázku je vzorek (+ duplicitní vzorek) pod UV lampou (Zdroj: autor).

Jeden kontrolní a jeden fotoaktivní vzorek byly vloženy pod UV lampu, stejně tak byly vzorky nachystány do tmy. Měření probíhalo po dobu (4 až 6) hodin. Jeden kontrolní vzorek (Přímý oplach) byl ihned zpracován.

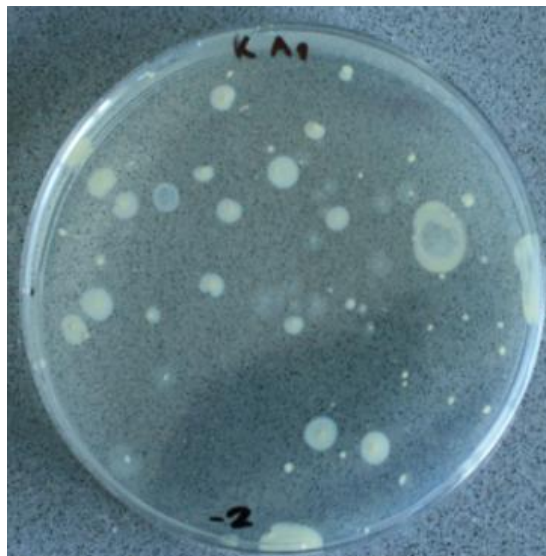
Po stanoveném čase byla z těchto Petriho misek odebrána testovací sklíčka, která byla vystavena tmě a umístěna pod UV lampou. Tato sklíčka byla vložena do sóji (10 ml) a byla vytřepána na vortexu (z důvodu dobrého vytřepání bakteriální suspenze do sóji). Dále bylo provedeno desetinásobné ředění bakteriální suspenze. Postup ředění probíhal následovně: bylo odebráno pipetou 1 ml roztoku ze sóji do první zkumavky, čímž pokračovala série 5 ředění. Vyšší řád ředění není potřeba, protože bakteriální inhibice je značná již při (-5). Petriho misky byly zality rozehrátým agarem a ponechány k zatuhnutí. Inkubační doba v termostatu byla 48 hodin při 37 °C.

### 3.3.2 Počítání kolonií

Po uplynutí inkubační doby byly z termostatu odebrány vzorky. Kolonie, které jsou těžce rozeznatelné (nepřehledné, slité, vzájemně přerostlé), se nazývají přemnožené. Přemnožené kolonie se nepočítají. Pozornost se soustředí pouze na takové vzorky, které jsou dobře počítatelné. Ideální počet kolonií odpovídá (30 až 300) buněk/ml.



Obrázek 6 Přemnožené bakterie *E. coli*  
(Zdroj: autor)



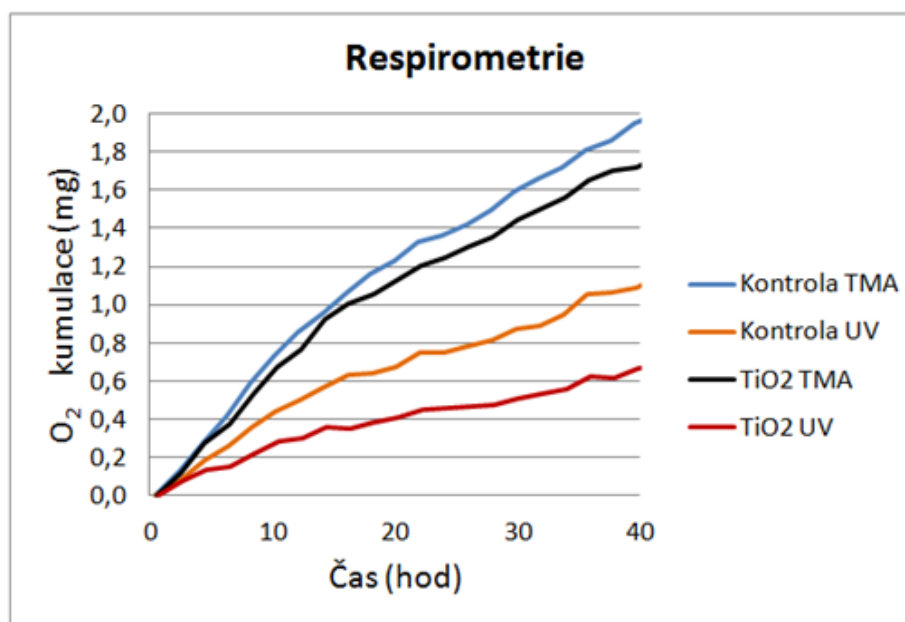
Obrázek 5 Ideální počet *E. coli*  
(Zdroj: autor)

## 4 Analýza výzkumných dat

V kapitole jsou prezentovány výsledky z respirometrického měření, Live/Dead metody, testování antibakteriální aktivity podle normy ISO 27447 a Jednofaktoriální ANOVY. Kromě těchto metod se doplňkově testovala analýza louhování oxidu titaničitého a hodnotil se povrch fotoaktivního filmu.

## 4.1 Hodnocení respirační aktivity

U grafu (viz Graf 1) z respirometrického měření se posuzuje vztah kumulace kyslíku (v jednotkách mg) k bakteriální populaci *E. coli* v průběhu 40 hodin. Čím níže se nalézá křivka respirace, tím více je utlumen metabolismus bakterií nebo je v daném vzorku menší počet bakteriální populace.



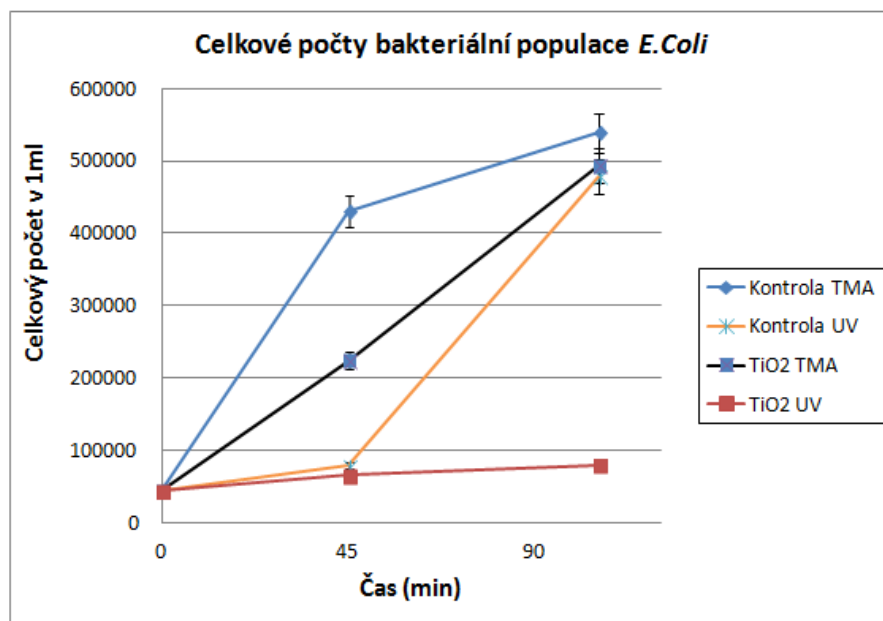
Graf 1: Respirometrie

Největší metabolická aktivita se projevila ve tmě. Modrá a černá křivka se liší pouze zanedbatelně. U UV záření byl fotoaktivní vzorek červené křivky o 38 % níže než kontrolní vzorek reprezentovaný oranžovou křivkou. Nejnižší červená křivka respirace byla u fotoaktivního nátěru (UV lampa). U křivek reprezentujících vzorky uchované ve tmě (černá a modrá) můžeme prokazatelně vidět, že fotoaktivní povrch potřebuje k tomu, aby dobře fungoval, právě UV světlo.

Dle výsledku z respirometrie můžeme říct, že UV záření společně s oxidem titaničitým má inhibiční vliv na bakterie. Graf spotřeby kyslíku byl v rámci směrodatné odchylky 2 %. Měření proběhlo duplicitně, a tudíž můžeme konstatovat, že výsledek byl v rámci 10 % chyby shodný.

## 4.2 Metoda Live/Dead

V grafu (viz Graf 2) byl zaznamenán celkový počet všech bakterií (mrtvé i živé). První měření všech vzorků bylo nulté. Vzorky byly měřeny po opakujícím se intervalu (0, 45, 105) min. V grafu byl zaznamenán maximální počet bakteriální populace *E. coli* ve tmě na obyčejném sklíčku. Minimální počet bakterií byl naměřen na fotoaktivním sklíčku, na které působila UV lampa.



Graf 2: Celkové počty bakteriální populace *E. coli*

Rozdíl fotoaktivního vzorku (černá křivka) od kontrolního (modrá křivka), byl v prostředí tma o 8 % níže. Pod UV lampou byl se zřetelným výsledkem fotoaktivní vzorek (červená křivka) o 84 % níže než kontrolní vzorek (oranžová křivka). Graf celkového výskytu bakteriální populace byl v rámci směrodatné odchylky 5 %.

## 4.3 Stanovení antibakteriální aktivity materiálů polovodičových fotokatalyzátorů, ISO 27447

Vyhodnocení metody (ISO 27447) a Jednofaktoriální ANOVY z naměřených dat (viz tab. 10, 11, 12 a 13).

#### 4.3.1 Vyhodnocení antibakteriální aktivity

Cílem metody bylo prokázat fotokatalytickou antibakteriální účinnost fotokatalyzátoru za simulace intenzity záření denního světla. K výpočtu byly použity průměry z naměřených dat (buněk/ml).

Tabulka 10: Měření č. 1

Měření A	Ředění -1	Ředění -2	Ředění -3	Ředění -4	Ředění -5
Přímý oplach	přerostlé	přerostlé	363	42	6
TiO <sub>2</sub> kontrola 1	přerostlé	824	122	9	1
TiO <sub>2</sub> kontrola 2	přerostlé	844	114	9	1
TiO <sub>2</sub> 1	562	39	4	0	0
TiO <sub>2</sub> 2	71	6	1	0	0
Tma kontrola	přerostlé	696	64	5	0
Tma 1	přerostlé	656	61	6	0
Tma 2	přerostlé	301	28	2	0

Tabulka 11: Měření č. 2

Měření B	Ředění -1	Ředění -2	Ředění -3	Ředění -4	Ředění -5
Přímý oplach	1576	přerostlé	363	42	6
TiO <sub>2</sub> kontrola	408	49	7	4	0
TiO <sub>2</sub> 1	76	8	2	0	0
TiO <sub>2</sub> 2	59	6	1	0	0
Tma kontrola	674	86	6	0	0
Tma 1	879	101	10	1	0
Tma 2	621	67	9	1	0

Tabulka 12: Měření č. 3

Měření C	Ředění -1	Ředění -2	Ředění -3	Ředění -4	Ředění -5
Přímý oplach	přerostlé	přerostlé	1084	150	11
TiO <sub>2</sub> kontrola 1	přerostlé	764	79	6	3
TiO <sub>2</sub> kontrola 2	přerostlé	2384	288	25	2
TiO <sub>2</sub> 1	452	57	6	2	0
TiO <sub>2</sub> 1	352	40	7	3	0
Tma kontrola	přerostlé	přerostlé	6	0	0
Tma 1	přerostlé	přerostlé	10	1	0
Tma 2	přerostlé	přerostlé	9	1	0

Tabulka 13: Měření č. 4

Měření D	Ředění -1	Ředění -2	Ředění -3	Ředění -4	Ředění -5
Přímý oplach 1	přerostlé	přerostlé	148	18	1
Přímý oplach 2	přerostlé	přerostlé	279	27	2
TiO <sub>2</sub> kontrola 1	přerostlé	431	43	5	0
TiO <sub>2</sub> kontrola 2	přerostlé	421	40	4	0
TiO <sub>2</sub> 1	78	13	3	0	0
TiO <sub>2</sub> 2	49	4	1	0	0
Tma kontrola 1	přerostlé	642	57	9	1
Tma kontrola 2	přerostlé	675	67	7	0
Tma 1	přerostlé	220	24	3	0
Tma 2	přerostlé	229	25	5	0



Naměřená data (viz tab. 10, 11, 12 a 13) byla matematicky vyhodnocena podle následujících vzorců:

$$\Delta R = \log \frac{Bl}{Cl} - \log \frac{Bd}{Cd} \qquad \qquad \qquad RL = \log \frac{Bl}{Cl}$$

Jestliže platí nerovnost ( $\log \frac{\text{kontrola tma}}{\text{fotoaktivní nátěr tma}} > 0$ ), pak bylo v kontrolním vzorku více E. coli (buněk/ml) než ve fotoaktivním vzorku. Tím by bylo potvrzeno, že vzorky potřebují k inaktivaci UV světlo. Oproti tomu, pokud by platila nerovnost ( $\log \frac{\text{kontrola tma}}{\text{fotoaktivní nátěr tma}} < 0$ ), pak by bylo více E. coli (buněk/ml) na fotoaktivním vzorku, a tedy by se prokázalo, že antibakteriální účinnost probíhá i za tmy.

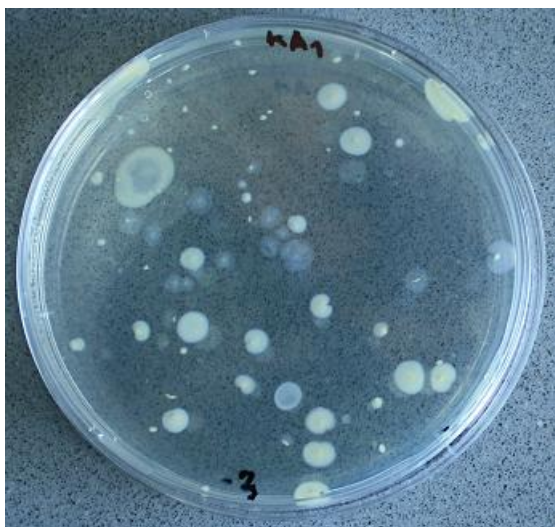
- **RL**: fotokatalytická antibakteriální činnost po UV ozáření (0,1 mW.cm<sup>-2</sup>)
- **ΔR**: fotokatalytická antibakteriální účinnost po UV ozáření s přihlédnutím na počet inkubovaných bakteriální ve tmě
- **(A-D)**: udává jednotlivá měření
- **B<sub>l</sub>, C<sub>l</sub>, B<sub>d</sub>, C<sub>d</sub>**: zkratky jsou vysvětlené, viz Kapitola. II5.1.5 )

Tabulka 14: Posouzení účinnosti fotokatalyzátoru

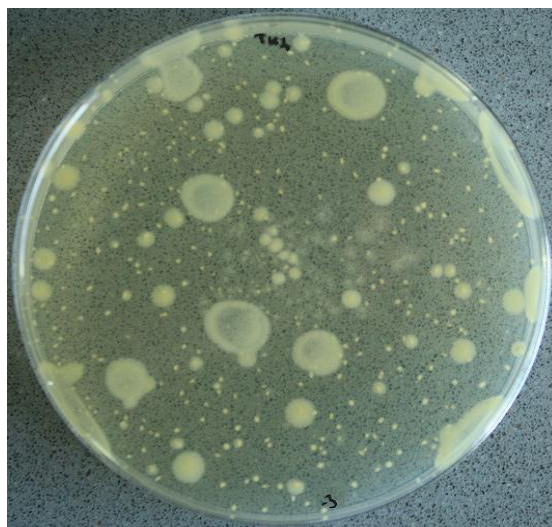
Escherichia coli 0,1 mW.cm <sup>-2</sup> po 4 hodiny		
	RL	ΔR
A	1,7	1,5
C	1,5	1,3
D	1,3	0,9
Průměr	1,50	1,23
Směrodatná odchylka	0,20	0,31

(pozn. z měření: u měření typu B vznikl statisticky vychýlený výsledek, nebyl započten do průměru odchylky RL = 0,8; ΔR = 0,8)

Z tabulky (viz tab. 14) je zřejmé, že vzorky potřebují k inaktivaci bakterií UV světlo. Nejefektivněji probíhala inaktivace na fotoaktivním ozářeném vzorku. Avšak úbytek bakterií byl i u ozářeného kontrolního vzorku oproti přímému oplachu. Je to z toho důvodu, protože bakterie neměly přirozené prostředí a světlo jim vysoušelo vlhký roztok, ve kterém byly umístěné.



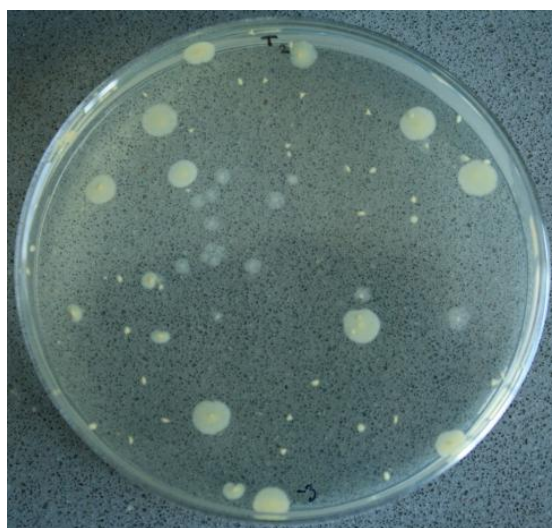
Obrázek 7: Kontrola pod UV lampou (Zdroj: autor)



Obrázek 8: Kontrola ve tmě (Zdroj: autor)



Obrázek 9: Fotoaktivní vrstva pod UV lampou (Zdroj: autor)



Obrázek 10: Fotoaktivní vrstva ve tmě (Zdroj: autor)

Dále bylo provedeno srovnání vzorků pro stanovení úbytku kolonií ve tmě a pod UV lampou. Byly vybrány vzorky ze třetího ředění. Na vzorcích umístěných pod UV lampou můžeme pozorovat, že na fotoaktivní vrstvě (viz Obrázek 9) byl zřetelný úbytek kolonií oproti kontrolnímu vzorku (viz Obrázek 7). Na rozdíl od vzorků ve tmě, zde nastal u fotoaktivního vzorku (viz Obrázek 10) menší úbytek kolonií vůči kontrolnímu vzorku (viz Obrázek 8).

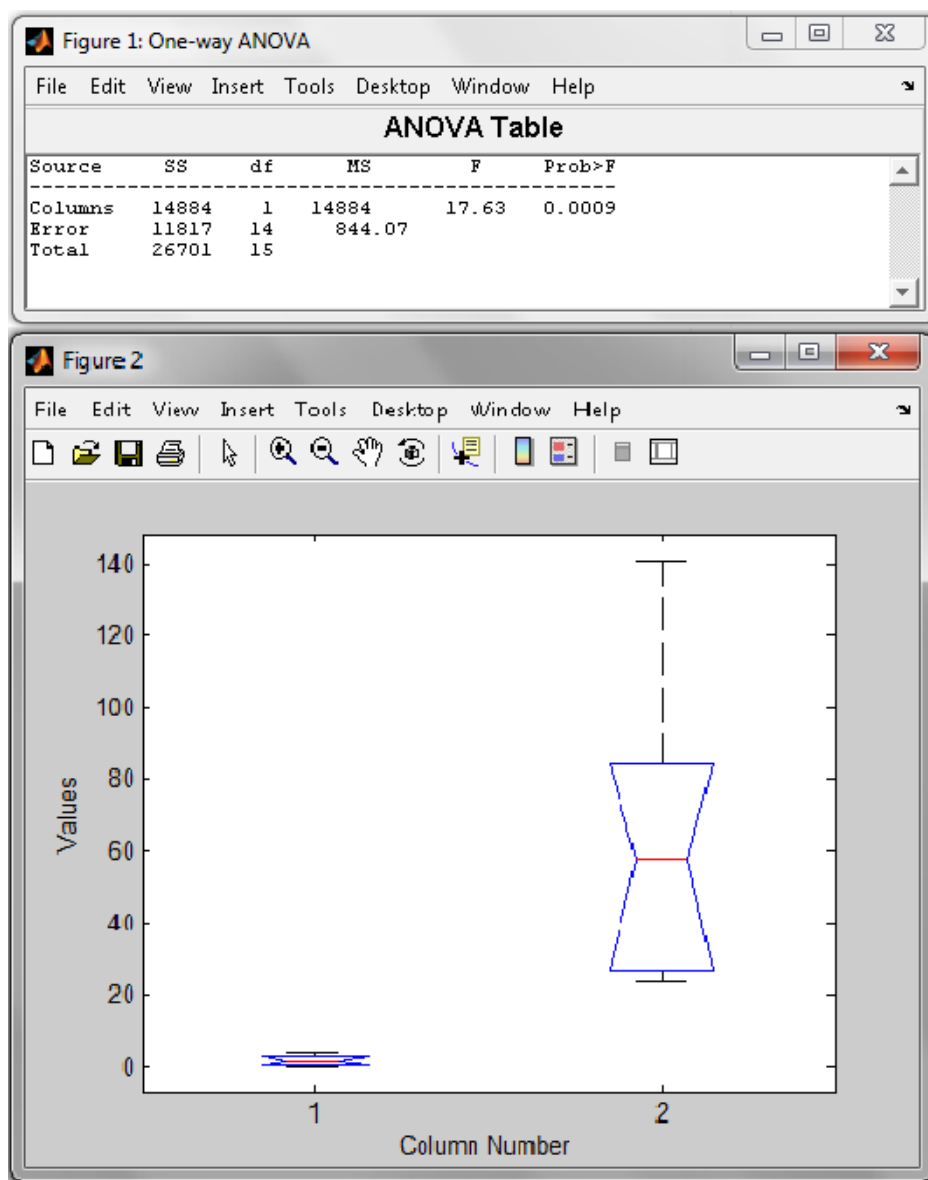
Z dosažených výsledků můžeme konstatovat závěr, že největší inhibice bakterií nastala u ozářeného fotoaktivního vzorku (viz Obrázek 9) a nejmenší u kontrolního vzorku ve tmě (viz Obrázek 8). Maximální inhibice se dosahuje při ozáření fotoaktivního vzorku světlem o odpovídající vlnové délce.

#### **4.3.2 Jednofaktoriální ANOVA**

Pro zjištění statisticky významného rozdílu naměřených výsledků pro vzorky pod UV lampou a ve tmě byla použita statistická metoda Jednofaktoriální ANOVA. Na základě naměřených hodnot jsme se pokusili zjistit, zda střední hodnoty nárůstu kolonií závisí na ozáření. Byla použita data z třetího ředění (fotoaktivní vzorky ze tmy a pod UV lampou).

K nalezení závislosti byla stanovena hypotéza  $H_0$ : jestliže se jednotlivé průměry skupin rovnají, tedy data ve tmě korespondují s daty pod UV lampou, jsou si skupiny podobné a nulová hypotéza se přijímá (testovací kritérium  $<$  kritická hodnota). V opačném případě se dané skupiny liší, čímž se nulová hypotéza zamítá a přijímá se alternativní hypotéza  $H_1$  (testovací kritérium  $>$  kritická hodnota).

Jednofaktoriální ANOVA byla vyhodnocena v prostředí MATLAB s výsledkem: testovací kritérium = 17,6 a kritická hodnota = 4,6. Testovací kritérium je větší než kritická hodnota a tedy lze přijmout alternativní hypotézu  $H_1$  „dané skupiny se statisticky liší“. Z grafu (viz Graf 3) plyne, že největší úbytek bakterií byl u fotoaktivních vzorků pod UV lampou.

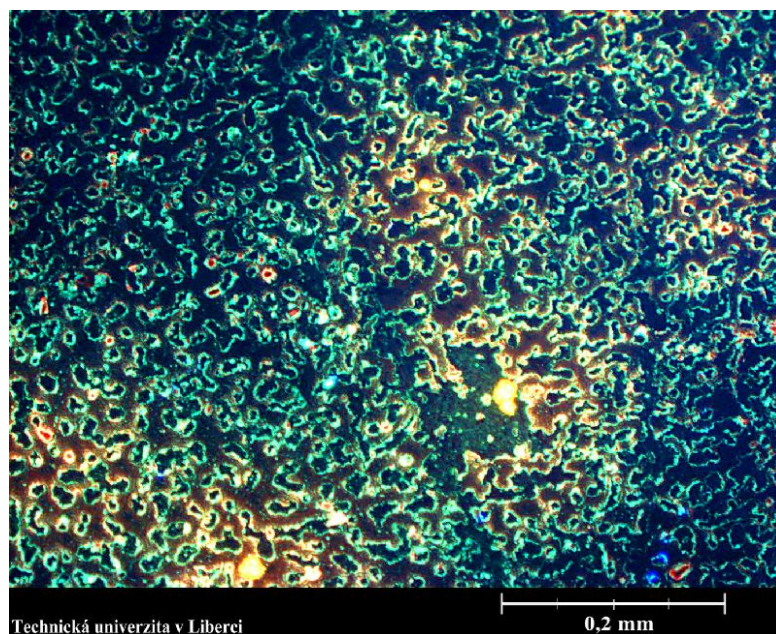


Graf 3: Jednofaktoriální ANOVA v MATLABU: Vzorky s fotoaktivním nátěrem se liší v situacích světlo (menší) a tma (větší), (Zdroj: autor).

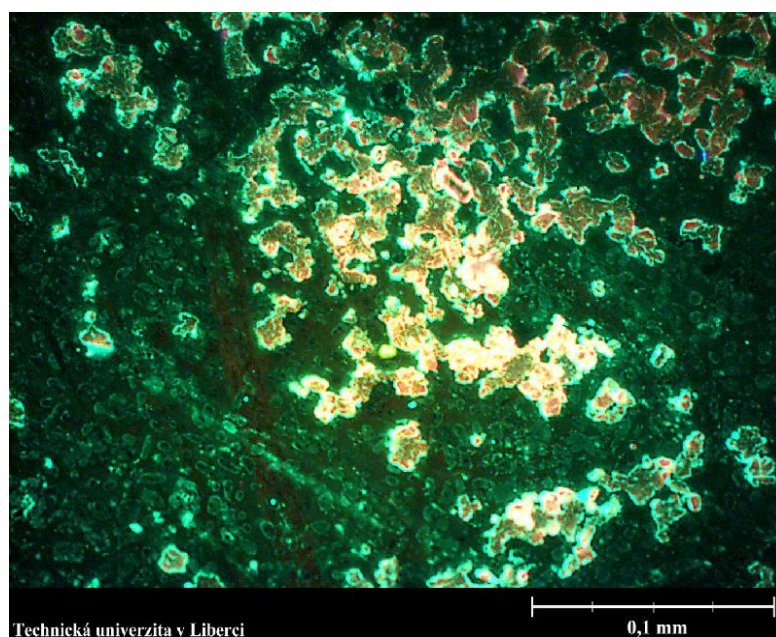
#### 4.4 Charakteristika povrchu fotoaktivního filmu

Na snímcích (viz Obrázek 11, Obrázek 12) jsou vyobrazené povrchy fotoaktivních vrstev v různém zvětšení prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu ZEISS Axio Imager.M2. Cílem bylo pokrýt rovnoměrně sklíčko vrstvou oxidu titaničitého metodou Dip coating. Avšak jak ukazují fotky, homogenního pokrytí nebylo dosaženo.





Obrázek 11 A) Fotoaktivní vrstvy potažené na sklíčkách metodou Dip coating (Zdroj: autor).



Obrázek 12 B) Fotoaktivní vrstvy potažené na sklíčkách metodou Dip coating (Zdroj: autor).

## 4.5 Analýza louhování oxidu titaničitého

Vzhledem k negativním názorům na používání nanomateriálů, vyplývajících z jejich rizik (jako je například nekontrolovatelný únik do okolí, viz Kapitola III.1), byl vzorek s oxidem titaničitým analyzován optickou emisní spektrometrií. Vzorek byl nanesen metodou Dip coating a po dobu jednoho týdne byl louhován ve fyziologickém roztoku.

Neprokázalo se (viz tab. 15), že by se oxid titaničitý uvolňoval do fyziologického roztoku. Experiment potvrdil dlouhodobou účinnost a mechanickou stabilitu vrstev oxidu titaničitého v pozorovaném časovém intervalu.

Tabulka 15: Analýza ICP

	(Ti mg/l)
Fyziologický roztok bez TiO <sub>2</sub> měření č. 1	< 0,005
Fyziologický roztok bez měření č. 2	< 0,005
Fyziologický roztok s TiO <sub>2</sub> měření č. 1	< 0,005
Fyziologický roztok s TiO <sub>2</sub> měření č. 2	< 0,005

## 5 Analýza výzkumných cílů a předpokladů

V literární rešerši bylo zkoumáno možné využití nanočástic v biologických aplikacích a jejich problematika. Ve výzkumné části se hodnotila interakce oxidu titaničitého s bakteriální populací E. coli. Testovala se antibakteriální aktivita. Jako nejvhodnější metoda byla shledána norma ISO 27447. V empirické části byly dále prověřeny hypotézy metodou Jednofaktoriální ANOVA prostřednictvím kvantitativního výzkumného šetření. Cíle práce byly tímto splněny.

## 6 Diskuze

V práci se zjišťovala antibakteriální aktivita bakteriální populace *E. coli*. Byly hodnoceny fotoaktivní vzorky vůči kontrolám ve tmě a pod UV lampou. Respirometrickou metodou se testoval bakteriální metabolismus. Bylo prokázáno, a to i při duplicitním měření, že nejnižší metabolická aktivita byla zaznamenána u ozářeného fotoaktivního vzorku. V případě prostředí ve tmě se zjistilo, že fotoaktivní povrch potřebuje ke své aktivaci světlo. V metodě Live/Dead se hodnotil celkový počet bakteriální populace. Byl zjištěn zvýšený počet *E. coli* za tmy, ale v případě kdy byl fotoaktivní vzorek osvětlen, byl počet *E. coli* nižší. V metodě podle normy ISO 27447 bylo ověřeno, že aby oxid titaničitý fungoval antibakteriálně, je nutné pracovat za přítomnosti UVA záření. Statistickou metodou Jednofaktoriální ANOVA byla zamítnuta hypotéza, že jsou střední hodnoty naměřených dat ve tmě a pod UV lampou srovnatelné, a naopak bylo prokázáno, že se střední hodnoty naměřených dat (fotoaktivních vzorků) liší. V kapitole Analýza povrchu fotoaktivního filmu se hodnotilo, zda je vhodná nanášecí metoda Dip coating. Bylo zjištěno, že se povrchy testovaných sklíček nepodařilo pokryt zcela homogenně. Lze uvažovat, zda nezvolit jinou metodu nanášení. V posledním experimentu se zkoumalo uvolňování oxidu titaničitého. Potvrdila se dlouhodobá účinnost a mechanická stabilita v pozorovaném časovém intervalu.

Pokusíme se porovnat výsledky práce se studiemi zabývající se fotokatalytickou aktivitou oxidu titaničitého. Ve výzkumu podle Erdurala a Bolukabasika se prokázala maximální antibakteriální aktivita na fotoaktivních vzorcích pod UV lampou. Naproti tomu byla minimální na vzorcích umístěných ve tmě a na kontrolních vzorcích pod UV lampou. [34] Další zmíněná studie podle Mika a Fishera se zaměřovala na nedopovanou fotokatalýzu oxidu titaničitého. Tato studie prokázala, že oxid titaničitý urychluje zprostředkovanou sluneční inaktivaci mikroorganismů a degraduje organické a anorganické nečistoty. [18]

## **7 Návrh doporučení pro praxi**

Vrstva oxidu titaničitého se nanáší jednoduchou cestou (nátěrem, nástřikem), podobně jako nátěrové barvy. Fotoaktivní nátěr se aplikuje na stěny nebo na strop v interiéru, ale i v místnostech bez oken, kde se používají fluorescenční lampy. Vrstva oxidu titaničitého je dlouhodobě stabilní, zdravotně nezávadná a nevyžaduje údržbu. Pokud je tato vrstva oxidu titaničitého ale mechanicky poškozena, snižuje se její účinnost.

Doporučovala bych, aby byla metoda využita především ve zdravotnických zařízeních. Fotoaktivní nátěr je vhodný v místech rizika šíření nákaz nemocí vzduchem. Nátěr je přínosný např. pro lidi trpící nemocemi bakteriálního původu nebo sníženou imunitou. Kromě odstraňování nečistot je nátěr vhodný i k eliminaci vzniklého kouře a zápachu, např. při elektrochirurgii.

Daná studie fotoaktivních filmů by se nadále mohla rozvíjet např. testováním stability naneseného filmu během několika měření, použitím dalších nanášecích technik nebo podrobným probádáním dopování fotokatalyzátoru oxidu titaničitého.



## IV Závěr

Cílem práce bylo prokázat fotokatalytickou antibakteriální účinnost fotokatalyzátoru prostřednictvím simulace denního světla. Fotokatalyzátorem byl nanokompozit (oxidu titaničitého/oxidu křemičitého), který se pomocí metody Dip coating nanese v podobě tenkého filmu na obyčejné sklíčko. V experimentech se testovaly fotoaktivní vrstvy vůči kontrolním vzorkům, pod UV lampou a ve tmě (při absenci světla). UV lampa vyzařovala záření o intenzitě  $0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$  při vlnové délce 365 nm. Testovala se bakteriální populace *E. coli* (o absorbanci 0.257). Testování antibakteriální aktivity proběhlo v souladu s normou ISO 27447.

Vzhledem ke zjištěným výsledkům z testovaných metod a z prověřených studií můžeme prokazatelně říci, že simulované denní světlo spolu s fotoaktivní vrstvou má vliv na úbytek bakteriální populace *E. coli* o 78 %. Cíle bakalářské práce byly splněny.

## V Seznam použité literatury

- [1] LI, Y. -S., & CHURCH, J. S. (2014). *Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials*. Journal of Food and Drug Analysis, 22(1), 29-48. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.003
- [2] PAVEL, HOUSER. SCIENCEWORLD. *Nanočástice umožní efektivní čištění vody solární energií* [online]. 2013 [cit. 2015-07-01]. Dostupné z: Dostupné z: Dostupné z: <http://www.scienceworld.cz/technologie/nanocastice-umozni-efektivni-cisten-vody-solarni-energii/>
- [3] PAVEL, HOUSER. SCIENCEWORLD. *Nanotechnologie v ČR – praktické aplikace*: [online]. 2006 [cit. 2015-07-01]. Dostupné z: <http://www.scienceworld.cz/neziva-priroda/nanotechnologie-v-cr-prakticke-aplikace-1236/>
- [4] LI, Q., MAHENDRA, S., LYON, D. Y., BRUNET, L., LIGA, M. V., LI, D., & ALVAREZ, P. J. J. (2008). *Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications*. Water Research, 42(18), 4591-4602. doi:10.1016/j.watres.2008.08.015
- [5] LV, X., WANG, P., BAI, R., CONG, Y., SUO, S., REN, X., & CHEN, C. (2014). *Inhibitory effect of silver nanomaterials on transmissible virus-induced host cell infections*. Biomaterials, 35(13), 4195-4203. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.01.054
- [6] KUNZMANN, A., ANDERSSON, B., THURNHERR, T., KRUG, H., SCHEYNIUS, A., & FADEEL, B. (2011). Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1810(3), 361-373. doi:10.1016/j.bbagen.2010.04.007
- [7] ZHANG, X.-Q., XU, X., BERTRAND, N., PRIDGEN, E., SWAMI, A., & FAROKHZAD, O. C. (2012). *Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine*. Advanced Drug Delivery Reviews, 64(13), 1363-1384. doi:10.1016/j.addr.2012.08.005

- [8] FILIPOVÁ, KUKUTSCHOVÁ, MAŠLÁŇ. *Rizika nanomateriálů*. 1. vyd. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2012, s. 26-34. ISBN 978-80-244-3201-4.
- [9] JOMINI, S., LABILLE, J., BAUDA, P., & PAGNOUT, C. (2012). Modifications of the bacterial reverse mutation test reveals mutagenicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and byproducts from a sunscreen TiO<sub>2</sub>-based nanocomposite. *Toxicology Letters*, 215(1), 54-61. doi:10.1016/j.toxlet.2012.09.012
- [10] NOVOTNÁ, Bc. Michaela. *Fotokatalytická aktivita tištěných vrstev oxidu titaničitého.* Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. on-line s. 8 [cit. 2015-04-17]. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=13514](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=13514)
- [11] *Katalýza* [online]. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. [cit. 2015-07-01]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/fch/prikladnik/prikladnik/p.8.7.html>
- [12] GÄRTNER, Harald. *Kompendium chemie: vzorce, pravidla a principy - úlohy a jejich řešení - periodická soustava prvků - výkladový slovník*. Vyd. 1. Praha: Euromedia Group - Knížní klub, 2007, 542 s. Universum (Knížní klub). ISBN 978-80-242-2012-3.
- [13] KULIČ, Jiří. *Heterogenní katalýza*. Pardubice: Vysoká škola chemicko-technologická v Pardubicích, 1982. č.21.514/79.
- [14] ZBOŘILOVÁ, Bc. Zdeňka. *Fotokatalytická aktivita hybridních vrstev oxidu titaničitého a křemičitého* [online]. Vysoké učení technické v Brně, 2013 [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: [https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/20869/DP\\_Z\\_Zborilova.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/20869/DP_Z_Zborilova.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [15] FUJISHIMA, Akira, Kazuhito HASHIMOTO a Toshiya WATANABE. *TiO<sub>2</sub>Fotokatalýza: základy a aplikace*. 1. vyd. Praha: Silikátový svaz, 2002. ISBN 80-903113-3-4.
- [16] LAJČÍKOVÁ, a PEKÁREK. *UV záření a jeho vliv na zdraví* [online]. Státní zdravotní ústav, Praha, 2009 [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://apps.szu.cz/svi/hygiena/archiv/h2009-2-05-full.pdf>

- [17] SYNNOTT, Damian W. a Suresh C. PILLAI. *Applied catalysis: Anti-bacterial activity of indoor-light activated photocatalysts*. Amsterdam: Elsevier, 2013, s. 106-111. ISBN 09263373. ISSN 1873-3883.
- [18] FISHER, Mike B. a Suresh C. PILLAI. *Applied catalysis: Nitrogen and copper doped solar light active TiO<sub>2</sub> photocatalysts for water decontamination*. Amsterdam: Elsevier, 2013, s. 8-13. ISBN 09263373. ISSN 1873-3883.
- [19] SEKEROVÁ, Bc. Kateřina. *Příprava a vlastnosti hybridních vrstev oxidu titaničitého a křemičitého*. [online]. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, ÚSTAV fyzikální a spotřební chemie., 2013 [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: [http://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=62811](http://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=62811)
- [20] SEKEROVÁ, Kateřina. *Porézní vrstvy oxidu titaničitého*. [online]. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, ÚSTAV fyzikální a spotřební chemie., 2011 [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=36473](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=36473).
- [21] HERMAN, B. a V.E.C FROHLICH. *Basic Concepts in Fluorescence* [online]. [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>
- [22] *Vyukový portál: Ústav biologie Lékařské fakulty, Olomouc: Fluorescenční barvivo*: [online]. [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/Fluorescencni%20barvivo.htm>
- [23] HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2001, s. 381, s. 255. ISBN 80-902896-1-4.
- [24] *Micro-Oxymax Layman's Guide to Measurement Principles: Columbus Instruments* [online] [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://www.columbusinstruments.com/PDF-Manuals/Micro-Oxymax/Primer.pdf>.

- [25] MUSILOVÁ, Petra. *Možnosti stanovení germania v potravinách: ICP OES* [online]. Brno, 2009 [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=16226](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=16226)
- [26] ISO 27447: Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics): Test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materials. 2009.
- [27] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. *Kompendium statistického zpracování dat: metody a řešené úlohy*. Vyd. 2., přeprac. a rozš. Praha: Academia, 2006, s. 982. ISBN 80-200-1396-2.
- [28] ZVÁRA, Karel a Josef ŠTĚPÁN. *Pravděpodobnost a matematická statistika*. 5. vyd. Praha: Matfyzpress, 2012, s. 230. ISBN 978-80-7378-218-4.
- [29] *Analýza rozptylu (ANOVA): Multimediální pomůcky na VFU - rozcestník* [online]. 2012 [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/statpotr/POTR/Teorie/Predn3/ANOVA.htm>
- [30] BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
- [31] RULÍK, M. a kol. *Mikrobiální biofilmy*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. 447 s., s. 57-58. ISBN 978-80-244-2747-8
- [32] PHARMA-REPORTS. *Klinicky významné bakterie*. 1. Vyd. Praha: Triton, 2012. 123 s., s. 47, 65, 90-92. ISBN 978-80-7387-588-6
- [33] CAREY, Roberta. SCHUSTER, Mindy. MCGOWAN, Karin. *Lékařská mikrobiologie v klinických případech*. 1.vyd. Praha: Triton, 2011. 321 s., s. 26-27. ISBN 978-80-7387-480-3
- [34] ERDURAL Beril a Ufkuk BOLUKBASI. Photocatalytic antibacterial activity of TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> thin films:: the effect of composition on cell adhesion and antibacterial activity, *Journal of Photochemistry and Photobiology a: Chemistry*, [online]. 2014, 29-37 [cit. 2015-07-02]. ISSN 1010-6030. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603014001063>

### Citace obrázků v příloze:

- [35] Obrázek: fotokatalýza: Antimikrobiální aktivita oxidu titaničitého [online]. 2012 [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/antimikrobialni-aktivita-oxidu-titaniciteho>
- [36] Obrázek:  $TiO_2$  - dokonalá fotokatalitická čistička vzduchu: Jak to funguje [online]. [cit. 2015-11-01]. Dostupné z: <http://www.tio2.cz/informace/jak-to-funguje>
- [37] MARTIN KOZÁK. Obrázek: Soubor:ElmgSpektrum.png: Wikimedia Commons [online]. 14 April 2007 [cit. 2015-11-01]. Dostupné pod licencí Creative Commons z: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e3/ElmgSpektrum.png>
- [38] Obrázek: Stukturní typy. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita. [online]. [cit. 2014-12-20]. Dostupné z: <http://www.chemi.muni.cz/~lobl/Projekt/Projekt.html>
- [39] Obrázek: Dip coating. [online]. [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://www.nadetech.com/index.php/en/technologies>
- [40] Obrázek: Fluorescence, energetické hladiny: WikiSkripta [online]. [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Fluorescence>
- [41] BRAIN, Marshall. Obrázek: *E. coli: How Cells Work* [online]. [cit. 2015-10-05]. Dostupné z: <http://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/cell1.htm>

## Seznam tabulek

---

Tabulka 1: IsoMet 1000 .....	33
Tabulka 2: BLB UVA Philips .....	33
Tabulka 3: UVX model UVX-36 .....	34
Tabulka 4: Columbus Instruments Micro-Oxymax .....	35
Tabulka 5: ICP OES .....	35
Tabulka 6: Určení koncentrace bakterií dle absorbance .....	36
Tabulka 7: kód: M001 .....	37
Tabulka 8: kód: M011 .....	38
Tabulka 9: kód: M002 .....	38
Tabulka 10: Měření č. 1 .....	47
Tabulka 11: Měření č. 2 .....	47
Tabulka 12: Měření č. 3 .....	48
Tabulka 13: Měření č. 4 .....	48
Tabulka 14: Posouzení účinnosti fotokatalyzátoru .....	49
Tabulka 15: Analýza ICP .....	54

## Seznam grafů

---

Graf 1: Spirometrie .....	45
Graf 2: Celkové počty bakteriální populace E. coli .....	46
Graf 3: Jednofaktoriální ANOVA v MATLABU: Vzorky s fotoaktivním nátěrem se liší v situacích světlo (menší) a tma (větší), (Zdroj: autor). .....	52

## Seznam obrázků

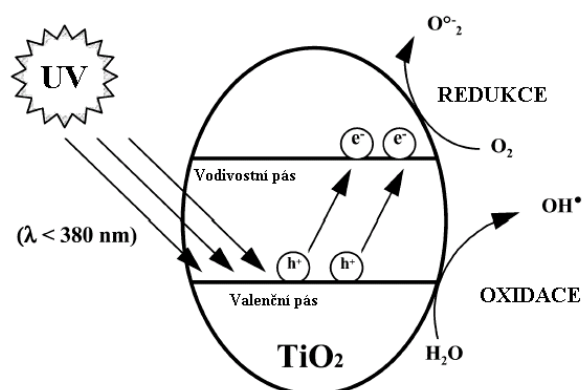
---

Obrázek 1: Sterilizátor Chirana řada HS 62A (Zdroj: autor). .....	40
Obrázek 2: Autokláv: UNISTERI HP (Zdroj: autor). .....	40
Obrázek 3: Spirometr Columbus Instruments Micro-Oxyma (Zdroj: autor). .....	41
Obrázek 4: Schéma přípravy metody (ISO 27447). Na obrázku je vzorek (+ duplicitní vzorek) pod UV lampou (Zdroj: autor). .....	43
Obrázek 5: Ideální počet E. coli (Zdroj: autor) .....	44
Obrázek 6: Přemnožené bakterie E. coli (Zdroj: autor) .....	44
Obrázek 7: Kontrola pod UV lampou (Zdroj: autor) .....	50
Obrázek 8: Kontrola ve tmě (Zdroj: autor) .....	50
Obrázek 9: Fotoaktivní vrstva pod UV lampou (Zdroj: autor) .....	50
Obrázek 10: Fotoaktivní vrstva ve tmě (Zdroj: autor) .....	50
Obrázek 11 A) Fotoaktivní vrstvy potažené na sklíčkách metodou Dip coating (Zdroj: autor). .....	53
Obrázek 12 B) Fotoaktivní vrstvy potažené na sklíčkách metodou Dip coating (Zdroj: autor). .....	53

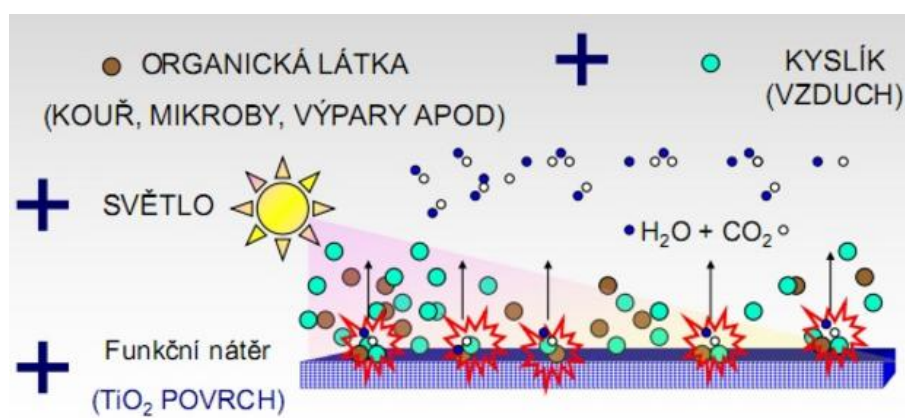
Obrázek 13: Popis průběhu fotokatalýzy [35].....	65
Obrázek 14: Fotokatalytická reakce [36] .....	65
Obrázek 15 Elektromagnetické spektrum, ultrafialové záření (růžové zvýraznění). [37] .....	65
Obrázek 16: Tetragonální mřížka Rutilu (vlevo), anatasu (vpravo). [38].....	66
Obrázek 17: Dip coating [39].....	66
Obrázek 18: Energetické hladiny – fluorescence [40] .....	66
Obrázek 19: Schéma metody, ISO 27447 [14] .....	67
Obrázek 20: Bakterie E. coli [41] .....	67



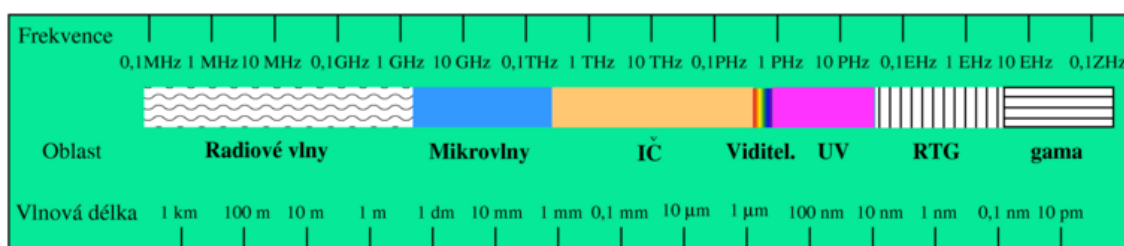
## Seznam příloh



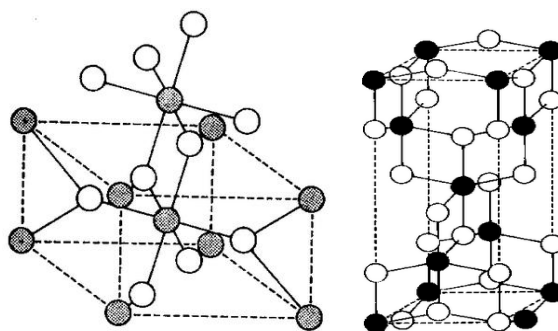
Obrázek 13: Popis průběhu fotokatalýzy [35]



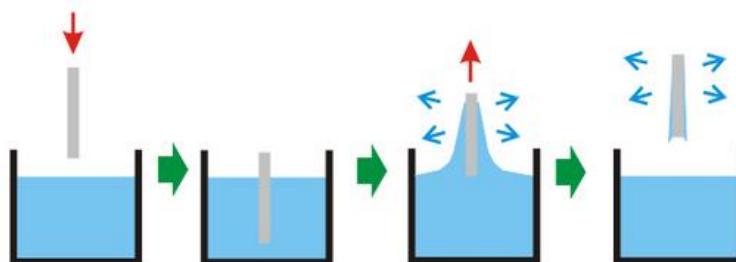
Obrázek 14: Fotokatalytická reakce [36]



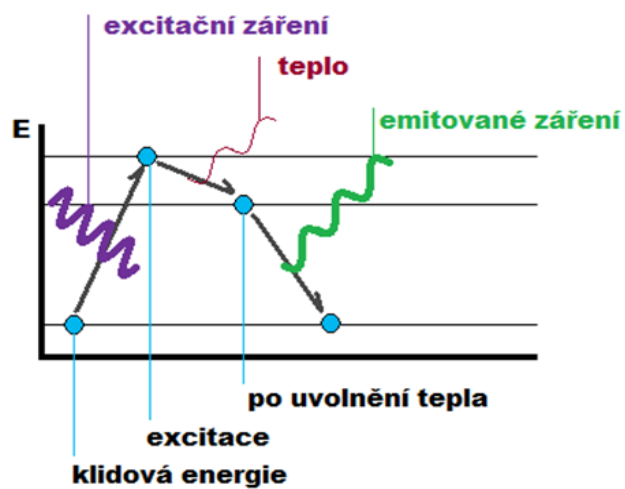
Obrázek 15 Elektromagnetické spektrum, ultrafialové záření (růžové zvýraznění). [37]



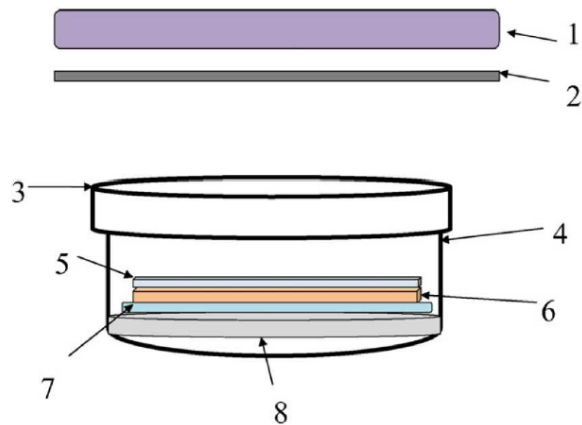
Obrázek 16: Tetragonální mřížka Rutilu (vlevo), anatasu (vpravo). [38]



Obrázek 17: Dip coating [39]

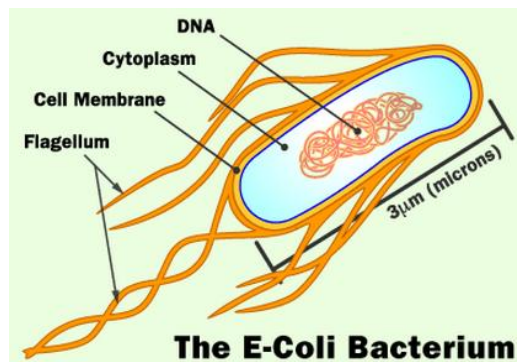


Obrázek 18: Energetické hladiny – fluorescence [40]



Obrázek 19: Schéma metody, ISO 27447 [14]

Legenda: 1) zdroj UV záření, 2) kovová deska, 3) skleněné víčko, 4) Petriho miska, 5) přilnavá skleněná nebo plastová vrstva, 6) testovaný vzorek s vrstvou bakteriální suspenze s *E. coli*, 7) skleněná trubička, 8) filtrační papír [14]



Obrázek 20: Bakterie *E. coli* [41]

## **Abstrakt**

Bakalářská práce se zaměřuje na nalezení vhodných technik k inhibici buněk mikroorganismů aplikací nanočástic na povrchy, kde je nutné zachovat vysoce sterilní prostředí. Cílem této práce je prověření hypotéz vlivu nanočástic oxidu titaničitého na bakteriální populace *E. coli*. Rešerše byla věnována odborným článkům, které se zabývaly tématem fotokatalýzy oxidu titaničitého. V práci byl zkoumán nanokompozit (oxid titaničitý/oxid křemičitý), který byl nanesen metodou Dip coating na testovací sklíčko. Fotoaktivní film a obyčejné sklíčko byly ověřovány v prostředí osvětleném UV světlem a ve tmě. Pro hodnocení interakce povrchů s oxidem titaničitým a *E. coli* byla použita norma ISO 27447 a statistická metoda Jednofaktoriální ANOVA. Dále byla zjišťována respirační aktivita bakterií a ukazatel Live/Dead. Výsledky experimentů potvrdily, že povrch fotoaktivní vrstvy potřebuje pro svoji funkčnost UVA záření.

## **Klíčová slova**

*E. coli*, denní světlo, fotokatalýza, nanočástice, oxid titaničitý

## **Abstract**

This bachelor thesis is focused on finding appropriate methodologies to inhibit cells by applying nanoparticles on surfaces where it is necessary to maintain a highly sterile environment. The aim of this work is to examine hypotheses concerning the impact of nanoparticles of titanium dioxide on bacterial populations *E. coli*. The research followed scientific articles focused on titanium dioxide photocatalysis topic. In this work, we have studied the nanocomposite (titanium dioxide/silicon dioxide) mounted on a plain slide using Dip coating method. The photoactive film and the plain slide were tested in UV light and dark environments. To evaluate the interaction with the titanium dioxide surfaces and the *E. coli* we used the standard ISO 27447 norm and Analysis of variance. Furthermore, the bacteria were tested for respiratory activity and Live/Dead. The experimental results confirmed that the surface of the photoactive layer needs for its functionality UVA radiation.

## **Keywords**

*E. coli*, daylight, photocatalysis, nanoparticles, titanium dioxide

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat Ing. Michaele Jakubičkové za vedení mé bakalářské práce, cenné rady a odborný dohled, trpělivost a ochotu. Děkuji také konzultantce Ing. Lucii Křiklavové, Ph.D. za odborný dohled a laskavou komunikaci a Bc. Alici Břečkové, Mgr. Petře Škodové a studentce Adéle Coufalové za asistenci v laboratoři.

Velké poděkování náleží celé mé rodině, přáteli a především svému bratru Mgr. Michalu Tuláčkovi za podporu, trpělivost a povzbuzování po dobu mého studia a jeho snoubence Bc. Martině Mandové za kontrolu anglického jazyka.

## Seznam zkratek

ANOVA	Analýza rozptylu
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
E. coli	Escherichia coli
G-	gramnegativní
G+	grampozitivní
H1	alternativní hypotéza
H <sub>0</sub>	nulová hypotéza
ICP OES	Optická emisní spektrometrie
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
NB	Nutrient Broth
PET	polyethylentereftalát
UV	ultrafialové záření
UV BLB	zářivka s černým sklem, vyzařující ultrafialové záření
ΔR	antibakteriální účinnost po UV ozáření, s přihlédnutím na tmu
RL	antibakteriální činnost po UV ozáření
Bl	průměrná hodnota kontrolních vzorků, poté co byly ozářeny
Cl	průměrná hodnota vzorků s fotoaktivní vrstvou, poté co byly ozářeny
Bd	průměrná hodnota kontrolních vzorků, poté co byly v temnu
Cd	průměrná hodnota vzorků s fotoaktivní vrstvou, poté co byly v temnu
tab.	tabulka
obr.	obrázek

# Obsah

<b>I</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>15</b>
<b>II</b>	<b>Teoretická část.....</b>	<b>17</b>
1	<i>Nanočástice .....</i>	<i>17</i>
1.1	Biomedicínské aplikace .....	17
2	<i>Fotokatalýza .....</i>	<i>18</i>
2.1	Katalyzátor .....	18
2.2	Fotokatalýza oxidu titaničitého .....	19
2.3	Ultrafialové záření .....	19
3	<i>Oxid titaničitý .....</i>	<i>21</i>
3.1	Rutil .....	21
3.2	Anatas .....	21
3.3	Brookit .....	21
3.4	Vlastnosti oxidu titaničitého .....	22
3.5	Využití oxidu titaničitého.....	22
3.6	Vrstvy oxidu titaničitého.....	22
3.7	Hybridní vrstvy .....	23
3.8	Metody nanášení vrstev .....	23
4	<i>Princip analytických metod .....</i>	<i>24</i>
4.1	Fluorescenční mikroskopie .....	24
4.2	Ultrafialovo-viditelná spektrometrie .....	24
4.3	Respirometrická metoda .....	25
4.4	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.....	25
5	<i>Principy testování fotokatalytických vrstev.....</i>	<i>26</i>
5.1	Metoda testování antibakteriální aktivity materiálů polovodičových fotokatalyzátorů podle normy ISO 27447: 2009.....	26
5.2	Jednofaktoriální analýza rozptylu .....	27
6	<i>Bakterie používané k testování antibakteriální aktivity podle normy ISO 27447 .....</i>	<i>29</i>
6.1	Gramovo barvení .....	29
6.2	Vliv ultrafialového záření na bakteriální buňku.....	30
6.3	Biofilm .....	30
6.4	Escherichia coli .....	30
6.5	Staphylococcus aureus .....	31
6.6	Klebsiella pneumoniae .....	31
<b>III</b>	<b>Výzkumná část .....</b>	<b>32</b>
1	<i>Cíle a výzkumné předpoklady:.....</i>	<i>32</i>
2	<i>Materiály a metody.....</i>	<i>32</i>
2.1	Přístroje.....	32
2.2	Software .....	36
2.3	Bakterie.....	36
2.4	Pevné půdy pro kultivaci bakterií .....	37
2.5	Příprava vzorku před testováním .....	39
3	<i>Metodika výzkumu .....</i>	<i>41</i>
3.1	Hodnocení respirační aktivity .....	41
3.2	Metoda Live/Dead® BacLight™ .....	42
3.3	Stanovení antibakteriální aktivity materiálů polovodičových fotokatalyzátorů, ISO 27447 .....	42
4	<i>Analýza výzkumných dat .....</i>	<i>44</i>



4.1	Hodnocení respirační aktivity .....	45
4.2	Metoda Live/Dead .....	46
4.3	Stanovení antibakteriální aktivity materiálů polovodičových fotokatalyzátorů, ISO 27447 .....	46
4.4	Charakteristika povrchu fotoaktivního filmu .....	52
4.5	Analýza louhování oxidu titaničitého .....	54
5	<i>Analýza výzkumných cílů a předpokladů</i> .....	54
6	<i>Diskuze</i> .....	55
7	<i>Návrh doporučení pro praxi</i> .....	56
<b>IV</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>57</b>
<b>V</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>58</b>

# I Úvod

Znečištěné ovzduší je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících kvalitu života lidí na Zemi. Již v minulosti člověk vytápěl svá obydlí, vypaloval lesy a taval rudu. Ve větší míře se tento problém začíná projevovat zejména se zahájením průmyslové revoluce v 18. století. Dále akceleroval s rozvojem průmyslové výroby a dopravy, když se převládajícím zdrojem energie stalo spalování uhlí. Velkokapacitní těžbou se snížila jeho cena a zvýšila dostupnost pro obyvatelstvo. Tím také došlo k masovému rozšíření lokálních, málo účinných topenišť, produkujících oxid uhličitý, který značně poškozuje životní prostředí, zejména u větších sídelních celků. Masový rozvoj automobilové dopravy ve 20. století tuto situaci dále zhoršoval.

Jednou z moderních možností, jak vzniklou situaci řešit, je využití fotokatalyckého jevu. Ve vývoji fotokatalýzy se do popředí zařadilo Japonsko, v důsledku průlomového objevu profesora Akira Fujishimi, který v roce 1967 popsal Fujishimův jev ve své disertační práci. Fotokatalýza je proces samovolného rozkladu nečistot, jako jsou prachové částice, plísňe, viry, bakterie a jiné, za působení katalyzátoru a světelného záření. Mezi nejběžněji užívaný fotokatalyzátor, který ovlivňuje urychlení chemické reakce, patří oxid titaničitý. Hlavním důvodem je jeho netoxicity a výjimečná chemická stálost.

Proces fotokatalýzy lze využít aplikací nánosu fotoaktivních vrstev oxidu titaničitého na povrchy. Toto opatření umožňuje výrazně zredukovat organické nečistoty z okolí, včetně bakterií a virů, a tím zlepšit životní prostředí zejména v místech, kde navzájem přichází do styku větší množství lidí, jako jsou úřady, kulturní domy, knihovny a další. Značné rozšíření by bylo žádoucí především ve zdravotnických zařízeních, kde je sterilita základním předpokladem pro zamezení šíření nemocí a úspěšnou léčbu pacientů. Využít by však šlo i v exteriérech, jako jsou obytné zóny, pozemní komunikace, tunely, nebo průmyslové objekty.

Hlavním výzkumným předmětem práce bylo hodnocení aplikace nanočástic oxidu titaničitého na povrchové struktury, s cílem posouzení inhibice bakteriální

populace *E. coli*. Dosažené výsledky, které byly změřeny v laboratoři, byly porovnány s odbornou literaturou.

V teoretické rešerši byla zpracována následující témata: katalýza, oxid titaničitý, bakterie používané pro antibakteriální testování a metody testování. Praktická část je zaměřená na analýzu antibakteriální aktivity oxidu titaničitého podle normy ISO 27447. V experimentech byla použita bakteriální populace *Escherichia coli*. V závěru práce bylo provedeno zhodnocení testovaných metod.

## **II Teoretická část**

### **1 Nanočástice**

Obor nanotechnologie se věnuje nanomateriálům, což jsou materiály obsahující nanočástice, jejichž rozměr dosahuje velikosti do 100 nm. Vzhledem k široké škále využití mají nanočástice velký potenciál uplatnění například v potravinářském průmyslu (např. nutriční doplňkové látky, silnější arómata, barviva, antibakteriální přísady v obalech potravin) či v zemědělských aplikacích (např. nano-krmiva pro kuřata). Integrace nanomateriálů s biologií vedla k vývoji diagnostických a terapeutických přístrojů, kontrastních látek, aplikací fyzikální terapie a dalších. [1]

#### **1.1 Biomedicínské aplikace**

Široké veřejnosti jsou známé komerčně úspěšné ponožky s nanočásticemi stříbra, které mají antibakteriální účinek a chrání proti pachu. Dále jsou v širokém povědomí nanočástice oxidu titaničitého, které se nanášejí na dlaždice, čímž se zaručuje hydrofóbnost, protože se kvůli specifickým vlastnostem na povrchu neusazují kapičky. I další sloučeniny lze využívat ve formě nanočástic, například železo v této formě napomáhá k čištění vody a oxid ceričitý ke snížení spotřeby pohonné hmoty. Velkou budoucnost nalézají v medicíně, protože vývoj směřuje k léčbě nádorů nebo rozvoji moderních zobrazovacích metod. [2, 3] Antimikrobiální vlastnosti sloučeniny stříbra a stříbrných iontů jsou historicky uznávané a používány v širokém rozsahu aplikací od dezinfekce zdravotnických prostředků až po domácí spotřebiče na úpravu vody. Nicméně, mechanismus toxicity stříbra je stále částečně nezodpovězenou otázkou. [4] Kromě toho bylo v in vitro studiích prokázáno, že kulovité nanočástice stříbra mohou být použity jako antivirová činidla v lidské imunoterapii. [5] V nedávných studiích bylo upozorněno, že nanočástice oxidu železitého mohou být použity k tepelné destrukci nádorů. Lokálně akumulované nanočástice umožňují tkáňovou specifickou hypertermii, která se přednostně zaměřuje na nádorovou tkáň a zároveň šetří normální tkáň. Dalším velmi využívaným nanomateriálem je zlato, které má široké uplatnění v mnoha různých

aplikacích. Zlato se používá k udržení stability a rozlišovací schopnosti barevných fotek, protože mimo jiné vyniká velmi dobrými katalytickými účinky. V biomedicině slouží soli zlata k léčbě revmatoidní artritidy, i když mechanismus účinku je stále předmětem diskuze. [6] Cílené terapeutické nanočástice, pojmenované BIND-014, mají slibné výsledky v probíhající klinické studii. Nanočástice se akumulují více v nádorech než ve zdravé buňce.[7]

Obor nanotechnologie je relativně novým odvětvím vědy. V současné době jsou kvůli možným účinkům na lidské zdraví podněcovány výzkumné studie (zejména na genotoxicitu). U mnoha nanočástic bylo zjištěno, že jsou příčinou chromozomální aberace, DNA zlomů, oxidativního poškození DNA a následné genetické mutace. [8] Rizika nastávají v případě nekontrolovatelného vniku částic do buněk, protože nanočástice mohou penetrovat jádro a způsobit poškození DNA. Při vdechnutí nanočástic do plic se materiál neodvratně naváže v plicních sklípcích a je schopen způsobit zánět a poškození alveolů. [9]

## 2 Fotokatalýza

Pojem fotokatalýza lze etymologicky rozložit na dvě slova:

- **foto** světelné záření
- **katalýza** chemická reakce

Fotochemické procesy (oxidačně-redukční) probíhají na povrchu polovodiče. Fotokatalýza spočívá ve vzájemném působení katalyzátoru a světla, při kterém dochází k rozkladu cizorodých látek. [10] Oxid titaničitý společně s UV zářením využívá heterogenní katalýzu, protože reakce probíhá ve dvou fázích.[11]

### 2.1 Katalyzátor

Katalyzátory ovlivňují rychlost chemické reakce, tím že snižují aktivační bariéru (k reakci je zapotřebí menší energie). Tato látka zůstává po skončení chemické reakce v

původním složení. Mezi významné katalyzátory patří kovy nebo jejich oxidy.[12] Katalyzátorem ale mohou být i jiné látky, v lidském těle jde například o enzymy.

### **2.1.1 Heterogenní katalyzátor**

U homogenní katalýzy jsou katalyzátor i reagující látka ve stejné fázi. Naopak u heterogenní katalýzy probíhají reakce v různých fázích (polovodič a světlo). Katalýza se rozděluje do více kroků:

- v prvním kroku se adsorbuje molekula, při které vznikne adsorbované teplo,
- v druhém kroku proběhne reakce s aktivační energií pro danou reakci,
- v třetím kroku nastane desorpce produktu, která spotřebuje teplo. [13]

Oxid titaničitý působí v přítomnosti UVA záření jako fotokatalyzátor. Foton dopadající na povrch katalyzátoru excituje elektron z valenčního pásu do vodivostního, čímž vzniká ve valenčním pásu kladně nabitá díra. Takto vzniklé náboje mohou spustit oxidačně redukční reakce na povrchu katalyzátoru. [14]

## **2.2 Fotokatalýza oxidu titaničitého**

Oxid titaničitý je polovodič, který je aktivován světelným zářením. V polovodičích jsou energetické hladiny uspořádány do elektrických pásů. (viz Obrázek 13). Dolní pás je valenční, horní pás je vodivostní. Mezi těmito pásy je zakázaný pás. Šířka zakázaného pásu rozděluje látky podle elektrické vodivosti [14]

Šířka zakázaného pásu oxidu titaničitého je 3,2 eV. Proto je ke vzniku fotokatalytické reakce na jeho povrchu zapotřebí záření s vlnovou délkou 365 nm, což odpovídá UVA záření. Při oxidačně-redukčních reakcích organických látek pak v ideálním případě vzniká oxid uhličitý a voda (viz Obrázek 14). [14]

## **2.3 Ultrafialové záření**

Ultrafialové záření (ultra-violet, UV) je elektromagnetické záření, které se v elektromagnetickém spektru nalézá mezi viditelným a rentgenovým zářením (viz Obrázek 15). Rozsah vlnových délek UV záření je 100 až 400 nm, což je méně než

u viditelného záření. [15] Podle vlnové délky světla lze dále rozlišovat tři typy UV záření, a sice UVA, UVB a UVC. [16]

Světelné paprsky Slunce nemohou dorazit v celém spektru na planetu Zemi, protože vlivem různých atmosférických vrstev, jako je např. ozonová vrstva nebo stratosféra, se část záření absorbuje. [15] Na povrch ze slunečního záření dopadá největší množství UVA (cca 90 až 99 %) a menší množství UVB, které se z velké části absorbuje v ozónové vrstvě, přičemž na povrch dopadá pouze 1 až 10 %. Naproti tomu UVC na zemský povrch nedopadá. [16]

- **Ultrafialové záření (A) - 400 až 320 nm**

Toto záření prostupuje do škáry (vazivová vrstva kůže pod pokožkou). Pozitivního vlivu záření se využívá pro léčbu lupenky (světloléčba). Naopak jeho negativním účinkem je to, že přispívá ke zrychlení stárnutí kůže, vzniku vrásek, strupovatění kůže a riziku vzniku kožního melanomu. UVA záření se používá do UV trubic v soláriu. [16]

- **Ultrafialové záření (B) - 320 až 280 nm**

Záření proniká do epidermis a napomáhá k opožděnému zhnědnutí kůže. Negativně působí UVB záření na DNA buňky, zde může vyvolat imunitní potlačení. Paprsky s menší vlnovou délkou jak 300 nm mají bakteriocidní účinky, a proto se převážně používají v germicidních lampách v laboratořích. [16]

- **Ultrafialové záření (C) - 280 až 100 nm**

Záření se vyskytuje v ionosféře a ionizuje ovzduší, čímž se tvoří ozón. Nejproduktivněji vzniká ozón při UV záření, které má vlnovou délku 200 nm. Ozón může mít neblahý vliv na lidské zdraví při narušení ozónové vrstvy. Do tkání proniká v menší míře. Častým místem reakce je ale spojivka. [16]

### 3 Oxid titaničitý

Oxid titaničitý je nejrozšířenější sloučeninou titanu. V přírodě se vyskytuje ve třech formách: anatas, rutil a brookit. Tyto minerály jsou polymorfní, což znamená, že se nemění jejich složení, ale odlišují se ve své struktuře. Jejich zabarvení se mění s příměsí různých kovů (např. železo). [14] Fotokatalytické vlastnosti oxidu titaničitého byly využity v různých environmentálních aplikacích k odstranění znečišťujících látek z vod a ovzduší. [5]

#### 3.1 Rutil

Rutil je ve srovnání s ostatními nerosty primární minerál. Organizace molekul rutilu je charakterizována tetragonální krystalickou strukturou (viz Obrázek 16). Rutil se vytváří působením vysokých teplot, takzvanou kalcinací, čímž vznikne jemný prášek. Typický barevný odstín bývá v rozmezí mezi červenou až černou, ale může mít i zlatavou barvu. Kromě toho mohou být krystaly místy i průsvitné. [14] Šířka zakázaného pásu je 3,0 eV. [17]

#### 3.2 Anatas

Anatas má rovněž tetragonální strukturu (viz Obrázek 16) při nízkých teplotách. Minerál je schopen absorbovat fotony UV světla s vlnovou délkou větší než 390 nm a má šířku zakázaného pásu 3,2 eV. Zajímavou vlastností je jeho změna v rutil při vysokých teplotách (okolo 915 °C). [14]

#### 3.3 Brookit

Brookit není moc využíván a má na rozdíl od ostatních minerálů odlišnou (ortorombickou) strukturu. Zabarvení nerostu je tmavě hnědé až zelenočerné. Je stabilní při nízkých teplotách, a při vysoké teplotě se jeho struktura (okolo 750 °C) mění na rutil podobně jako u anatasu. Šířka zakázaného pásu je 3,3 eV. [14]



### 3.4 Vlastnosti oxidu titaničitého

- Mechanická odolnost (vůči klimatickým podmínkám)
- Chemická stabilita (tvar oxidu zůstává po chemické reakci v původním stavu)
- Foto-stabilita (ve viditelné a infračervené oblasti)
- Optické vlastnosti (vysoká transparentnost, velký index lomu)
- Netoxický (nevytváří škodlivé vedlejší produkty)

Oxid titaničitý je vzhledem ke svým specifickým vlastnostem vhodný pro širokou škálu využití, protože je netoxický, ekonomicky přijatelný, stabilní a foto-aktivní. [14]

### 3.5 Využití oxidu titaničitého

Oxid titaničitý má v komerčních technologiích velmi důležité zastoupení. Vyskytuje se jako minerál s optickými a elektrickými vlastnostmi, které jsou vhodné pro řadu aplikací v oblasti foto-voltaiky a senzorů. Dále se používá jako bílý pigment, neboť má se svou výraznou bělostí velké uplatnění ve stavebnictví nebo v kosmetickém a potravinářském průmyslu. [14] Popularita nanočástic oxidu titaničitého roste s rozvojem fotokatalyzátorů, protože při začlenění nanočástic do dlaždic pomáhá samočistit povrchy, a to především ve veřejných prostorech (školy, úřady a jiné). [17]

### 3.6 Vrstvy oxidu titaničitého

Pomocí vrstev oxidu titaničitého lze vytvořit průhledný, dobře adhezni povlak. Není však vhodný pro aplikaci na PET lahve, ale pouze na (borosilikátové) sklo, protože musí vydržet vysoké teploty do 600 °C. Bylo zjištěno, že se zlepšuje přilnavost povrchu, pokud se zahřeje na 450 °C. Tato metoda není univerzální způsob nanášení, protože pouze část prekurzorů je vhodná k tepelnému zpracování. [18]

### 3.7 Hybridní vrstvy

Při fotokatalýze se z důvodu velmi dobrých vlastností využívají hybridní vrstvy oxidu titaničitého. Bylo prokázáno, že oxid titaničitý má malou mechanickou odolnost. Po přidání oxidu křemičitého se zlepšila mechanická stabilita materiálu, omezilo se šíření titaničitých zrn a pozitivně se zlepšila adheze. Oxid křemičitý má dále prokazatelný vliv absorpce na povrchu materiálu a chová se jako absorbent. V blízkosti vrstvy takzvaně zvyšuje koncentraci organických nečistot, a tím i zvyšuje rychlost fotokatalýzy. [19]

Povrch se reguluje hmotnostním poměrem (oxid titaničitý - oxid křemičitý). Pokud je zvýšené množství oxidu titaničitého, pak se shlukuje. Pokud je zvýšené množství oxidu křemičitého, pak se izoluje a oxid titaničitý se naváže na oxid křemičitý. Optimální vrstva je titan-kyslík-křemík, přičemž povrch je hydrofilní. [19]

### 3.8 Metody nanášení vrstev

Oxid titaničitý využíváme v práškové formě nebo pevně uchycený na substrát. K nanesení pevně uchyceného filmu na nečinný nosič lze využít různé techniky. Vrstvy se na povrch nanášejí různými metodami, jako je například Dip coating. [20]

#### 3.8.1 Dip coating

Metoda se řadí mezi namáčecí techniky (viz Obrázek 17). Dip coating se skládá z několika kroků: ponoření, vynoření a zgelovatění. Nejprve se skleněný substrát ponoří do roztoku. Poté je substrát vytažen přesně danou rychlostí. Konečnou fází procesu je zgelovatění, kdy se odpařuje rozpouštědlo z povrchu substrátu a na povrchu se vytvoří vrstva oxidu titaničitého. Tloušťka vrstvy je přibližně 20 nm až 50  $\mu\text{m}$ . Tloušťka vrstvy je ovlivněna rychlostí a úhlem vytahování a viskozitou roztoku. [20]

## **4 Princip analytických metod**

V této části budou podrobněji představeny jednotlivé analytické metody a jejich princip.

### **4.1 Fluorescenční mikroskopie**

Při fluorescenční mikroskopii se pro pozorování bakteriální buňky využívá luminiscence neboli spontánní záření vybuzených molekul. V případě, že jsou molekuly vybuzeny fotony UV nebo viditelného světla, nazývá se tento jev jako fotoluminiscence. Tento jev se dále rozděluje do dvou kategorií (fluorescence, fosforescence), v závislosti na elektronové konfiguraci excitovaného stavu a emisní dráze. [21]

#### **4.1.1 Fluorescenční jev**

Fotony dopadají na molekulu fluorescenčního barviva (fluorofor, fluorochrom). Elektron absorbuje energii a je excitován do vyšší energetické hladiny (viz Obrázek 18). Tento stav není stabilní a elektron se po čase přesouvá zpět na nižší energetickou hladinu, čímž se část jeho energie vyzáří v podobě tepla. Proto má foton méně energie a vlnová délka emitovaného světla je delší než v případě světla excitovaného. [22]

#### **4.1.2 Fluorescenční barvení**

Fluorescenční barvení se používá ke zviditelnění molekul a buněk, které nemají vlastnost auto-fluorescence. Barvicí látka se naváže na buněčné struktury (např. DNA) a na protilátku bílkovin přítomnou v cytoplazmě. Barvivo ve své molekule obsahuje reaktivní skupinu, která je schopna reagovat s nukleofilními skupinami. Touto metodou lze zviditelnit cytoskelet, chromatin a membránové bílkoviny. [21, 23]

### **4.2 Ultrafialovo-viditelná spektrometrie**

Princip ultrafialovo-viditelné spektrometrie je založen na Lambert-Beerově zákoně, který stanoví závislost tloušťky, absorpce a koncentrace látky. Metoda spočívá

v průchodu toku záření o určité vlnové délce skrz kyvetu s testovaným vzorkem. Při dopadu záření se část tohoto záření absorbuje, část rozptýlí a část odrazí. [14]

### **4.3 Respirometrická metoda**

Respirometrická metoda spočívá v periodickém monitorování systému s uzavřeným okruhem. Monitoruje se koncentrace plynu z materiálu, čímž se analyzuje mikrobiální dýchání. Měřicí přístroj udává přírůstek a spotřebu plynu a používá několik typů snímačů. [24]

Koncentrace kyslíku se měří paramagnetickým senzorem, neboť kyslík vykazuje poměrně unikátní chování v magnetickém poli. Vzorek plynu prochází okolo tyčinky a paramagnetické vlastnosti tlačí kyslík na tyčinku, což způsobuje, že se tyčinka otáčí. Otáčení tyčinky je přímo úměrné koncentraci kyslíku v plynu (čím více je přítomno kyslíku, tím větší je rotace). [24]

### **4.4 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem**

Optická emisní spektrometrie je analytická metoda, která stanovuje koncentrace jednotlivých prvků ze vzorku. Tento přístroj umožňuje analyzovat téměř všechny prvky periodické tabulky (80 %). Roztok vzorku je zmlžen a vzniklá mlha je proudem argonu vedena do hořáku. Vzhledem k vysoké teplotě plazmy se rozpouštědlo okamžitě odpaří, čímž zanikají chemické vazby v molekulách přítomných sloučenin a elektrony se excitují do vyšších energetických hladin. Tento stav není stabilní a elektrony se vrací zpět na základní energetickou hladinu. Emitované světlo přechází do monochromátoru, kde se světelné záření rozdělí podle vlnových délek. Fotony rozděleného záření analyzuje detektor, který změní intenzitu dopadajícího záření na elektrický signál, který lze změřit. [25]

## **5 Principy testování fotokatalytických vrstev**

V této části budou podrobněji představeny jednotlivé metody, které testují fotokatalytické vrstvy.

### **5.1 Metoda testování antibakteriální aktivity materiálů polovodičových fotokatalyzátorů podle normy ISO 27447: 2009**

Norma stanovuje dvě metody testování, mezi které se řadí skleněná adhezní metoda a filmová adhezní metoda. Skleněná adhezní metoda se užívá pro tkaniny či textilie, protože je chrání před deformací. Tato metoda se užívá k analýze bakteriální populace *Staphylococcus aureus* a *Klebsiella pneumoniae*. Filmová adhezní metoda se používá u pevných materiálů, kde se analyzují s ní bakteriální populace *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. [26]

#### **5.1.1 Postup přípravy**

Na dno Petriho misky se umístí zvlhčený filtrační papír, na který se položí skleněné trubičky tak, aby sklíčko nepřišlo do kontaktu s vlhčeným papírem. Na trubičky se následně přiloží testovaný vzorek (viz Obrázek 19). [26]

#### **5.1.2 Filmová adhezní metoda**

Pro měření podle filmové adhezní metody musíme mít připravené inokulum s testovanou bakterií o koncentraci, která odpovídá prvnímu stupni Mc Farlandova zákalu. Na testovací vzorek se nanáší 0,15 ml bakteriální suspenze. [26]

#### **5.1.3 Zvolení intenzity ultrafialového záření**

Maximální intenzity záření se dosahuje za dne vedle okna ( $0,25 \text{ mW.cm}^{-2}$ ) nebo ve vzdálenosti 1,5 m od okna ( $0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$ ) při použití fluorescenční lampy. Minimální intenzity záření je naopak dosahováno v zatemněné místnosti bez oken, při užití pouze vnitřního světla ( $0,001 \text{ mW.cm}^{-2}$ ). [26]

#### 5.1.4 Vyhodnocení vzorků

Desetinásobné ředění bakteriální suspenze je zalito živnou pevnou půdou. Vzorky se vkládají do termostatu při teplotě 37 °C. Po uplynutí intervalu 24 – 48 hodin se vzorky počítají a vyhodnocují. [26]

#### 5.1.5 Vyhodnocení výsledků antibakteriální aktivity

Matematické vyhodnocení výsledků můžeme vyjádřit následovně:

- **RL:** fotokatalytická antibakteriální činnost po UV ozáření (intenzity L)
- **ΔR:** fotokatalytická antibakteriální účinnost po UV ozáření s přihlédnutím na počet inkubovaných bakterií ve tmě

$$\Delta R = \log \frac{B_l}{C_l} - \log \frac{B_d}{C_d}$$

$$RL = \log \frac{B_l}{C_l}$$

- $B_d$  Průměrná hodnota kontrolních vzorků, poté co byly v temnu.
- $C_d$  Průměrná hodnota vzorků s fotoaktivní vrstvou, poté co byly v temnu.
- $B_l$  Průměrná hodnota kontrolních vzorků, poté co byly vystaveny záření.
- $C_l$  Průměrná hodnota vzorků s fotoaktivní vrstvou, poté co byly vystaveny záření.

Výše uvedený výpočet je důležitý pro důkaz inhibice bakterií, ke které došlo za pomoci fotokatalýzy. [26]

## 5.2 Jednofaktoriální analýza rozptylu

Tato statistická metoda umožňuje zjistit, jestli na sobě závisí dva náhodné vektory. K tomu užijeme metodu “analýzy rozptylu”, která je označena též jako ANOVA (Analysis of variance). [27, 28, 29]

Testujeme nulovou hypotézu ( $H_0$ ), že se jednotlivé průměry rovnají. V případě že ano ( $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ ), jsou si skupiny navzájem podobné a nulová hypotéza se přijímá. V opačném případě nulovou hypotézu zamítáme, přijímáme alternativní hypotézu ( $H_1$ ), že se jednotlivé skupiny od sebe liší ( $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$ ). [27, 28, 29]

Jednofaktoriální analýza rozptylu pomocí průměrů dat zjišťuje závislost mezi více skupinami. K vyhodnocení se musí provést 6 kroků: mezitřídní součet čtverců, vnitřní součet čtverců, kritická hodnota, testovací kritérium, mezitřídní průměr čtverců a vnitřní průměr čtverců. [27, 28, 29]

Pro rozpoznání závislosti se počítá testovací kritérium a kritická hodnota. V případě, že hodnota testovacího kritéria bude větší než kritická hodnota, bude zamítnuta nulová hypotéza o shodě rozptylů a přijme se hypotéza, že se hodnoty liší. V opačném případě bude nulová hypotéza přijata, a lze říci, že jsou si hodnoty navzájem podobné. Jejich závislost tím bude potvrzena. [27, 28, 29]

Testovací kritérium se stanovuje pomocí mezitřídního průměru čtverců a vnitřního průměru čtverců, poměr těchto hodnot se spolu s kritickou hodnotou užívá k vyhodnocení nulové hypotézy. Pro určení kritické hodnoty porovnáváme hodnoty stupňů volnosti s tabulkou (95% kvantil F rozdělení, přičemž hladina spolehlivosti  $\alpha = 0,05$ ). Na místě čitatele je stupeň volnosti pro rozptyl průměrů ( $V_p$ ) a na místě jmenovatele je stupeň volnosti reziduálního rozptylu ( $V$ ). [27, 28, 29]

### 5.2.1 Mezitřídní součet čtverců

$$SS_{MEZ} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$$

### 5.2.2 Vnitřní součet čtverců

$$SS_{vni} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$$

### 5.2.3 Mezitřídní průměr čtverce

$$MSA = \frac{SS_{mez}}{k - 1}$$

### 5.2.4 Vnitřní průměr čtverce

$$MSB = \frac{SS_{vni}}{N - k}$$

### 5.2.5 Testovací kritérium

$$F = \frac{MSA}{MSB}$$

### 5.2.6 Kritická hodnota

$$F_{\text{krit}} = F_{\alpha} [V_p, V]$$

$$V_p = k-1$$

$$V = N-1$$

( $n_i$  = počet měření,  $x_{ij}$  = naměřená hodnota,  $\bar{x}_i$  = průměrná hodnota jednoho sloupce,  $\bar{x}$  = celková průměrná hodnota,  $k$  = počet tříd,  $N$  = (počet tříd x počet měření)) [27, 28, 29]

## 6 Bakterie používané k testování antibakteriální aktivity podle normy ISO 27447

Mikroorganismy jsou charakteristické prokaryontní buňkou (buňka *E. coli* viz Obrázek 20) a mají tedy jednodušší stavbu oproti buňce živočišné. Bakteriální buňky obsahují nukleoid, cytoplazmatickou membránu, buněčnou stěnu a ribozomy. Rozsah jejich velikostí je rozmanitý (od  $0,3 \times 0,3 \mu\text{m}$  až po  $25 \times 10 \mu\text{m}$ ). Nejčastějšími tvary jsou tyčinky, koky, dvojice, řetízky (např. streptokoky) či shluky (např. stafylokoky). [30]

### 6.1 Gramovo barvení

K rozlišení typu bakterií používáme metodu Gramova barvení. Rozdíly mezi typy bakterií vyplývají z odlišné stavby buněčné stěny. Princip metody spočívá v obarvení bakterií krystalovou violetí, která se posléze odbarvuje etanolem. Grampozitivní bakterie jsou po aplikaci barvení modrofialové. Naproti tomu gramnegativní bakterie jsou odbarvené, avšak tyto buňky je možné znovu obarvit (např. červeně). [30]



## **6.2 Vliv ultrafialového záření na bakteriální buňku**

UV záření způsobuje u bakteriální buňky poškození biologické funkce, což může vést až ke smrti mikroorganismu. Základním vnějším projevem usmrcené bakterie je, že ztratila schopnost se rozmnožovat. Na UV záření jsou nejvíce citlivé nukleonové kyseliny (maximální absorpce 260 nm) a bílkoviny (maximální absorpce 180 a 280 nm). U nukleových kyselin působením záření např. vznikají kovalentní vazby uvnitř molekuly či dojde k přetržení řetězce. [30]

## **6.3 Biofilm**

Bakterie rostoucí ve formě biofilmu způsobují celou řadu chronických, a vzhledem k jejich rezistenci i obtížně eliminovatelných infekcí. Mezi nejběžněji vyskytující se bakterie se řadí *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*. Pro biofilmové infekce je typické, že bývají mnohdy způsobeny mikroorganismy, které jsou součástí běžné mikroflóry. Biofilm se dále vytváří snadno na dlouhodobě zavedených katétrech, tracheálních cévkách a na umělých implantátech (např. umělé srdeční chlopně, kardiostimulátory, umělé kloubní náhrady a nitroděložní tělíka). [31]

## **6.4 Escherichia coli**

*Escherichia coli* je gramnegativní, fakultativně anaerobní, nesporulující bakterie (viz Obrázek 20). Za normálních podmínek má bakterie tvar tyčinky a dosahuje délky 2  $\mu\text{m}$  a tloušťky 0,5  $\mu\text{m}$ . Tato bakterie patří mezi bičíkovce a je tedy díky disponujícímu bičíku schopná pohybu. Bakterie se běžně nachází v zažívacím traktu a je hostiteli prospěšná, neboť mu dodává vitamín  $\text{K}_2$  a chrání jeho trávicí trakt před osídlením choroboplodnými bakteriemi. Mimo střevo je bakterie patogenní, jelikož způsobuje gastroenteritidy, močové infekce, novorozeneckou meningitidu nebo peritonitidu. [32, 33]

## **6.5 Staphylococcus aureus**

*Staphylococcus aureus* je grampozitivní kulovitá bakterie, která je v českém jazyce označována jako zlatý stafylokok. Bakterii objevil skotský chirurg Ogston v roce 1980, který bakterii izoloval z operačních hnisavých ran. Bakterie je jednou z pěti příčin nozokomiálních infekcí a vyskytuje se především na sliznici dýchacích cest a rukou. [32]

## **6.6 Klebsiella pneumoniae**

*Klebsiella pneumoniae* je gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie, vyskytující se běžně ve fyziologické flóře úst, na kůži a v zažívacím traktu. *Klebsiella pneumoniae* je po *E. coli* druhým nejčastějším původcem močových infekcí, především u starších pacientů a u pacientů s chronickými plicními chorobami. Vyvolává gastrointestinální potíže a atrofii nosní sliznice a je dále hlavním zdrojem infekce z fekálního znečištění. Většina infekcí se vyskytuje jako nozokomiální při pobytu v nemocnici. [32]

### **III Výzkumná část**

#### **1 Cíle a výzkumné předpoklady:**

- Seznámení se s problematikou nanomateriálů.
- Rešerše na dané téma interakce nanomateriálů v biologických aplikacích.
- Vyhodnocení bakteriální populace E. coli.
- Navržení vhodné metodiky k inhibici buněk za využití aplikace nanočástic na povrchy v prostředí, kde je nutné zachovat vysoce sterilní podmínky.
- Prověření hypotéz vlivu nanočástic na bakteriální populace.

#### **2 Materiály a metody**

K hodnocení antibakteriální aktivity byly uvedeny všechny použité přístroje, software, bakterie, kultivační půdy a testovací vzorky.

##### **2.1 Přístroje**

V této kapitole byly stručně popsány přístroje, které byly použity v praktické části.

###### **2.1.1 Autokláv - UNISTERI HP**

Parní sterilizátor, který sterilizuje roztoky, laboratorní nádobí a nástroje párou (134 °C/7 min) a je vhodný i pro vaření půd. Tlaková komora má objem 73 litrů, sterilizátor podporuje 20 sterilizačních programů.

###### **2.1.2 Diamantová pila - IsoMet 1000**

Diamantová pila se používá pro přesné řezání jakéhokoliv materiálu. Skládá se z mikrometru, goniometru, diamantového kotouče, přitlačného ramena a nálevky.

Vestavěným mikrometrem se měří a upevňuje vzorek, goniometrem se nastavuje požadovaný úhel.

Tabulka 1: IsoMet 1000

Technické parametry	
Motor	95 W, 220 V
Otáčky měnitelné	(0 až 950) otáček / minutu
Maximální rozměry vzorku	do 38,1 mm
Maximální délka vzorku	do 203 mm

### 2.1.3 Výrobek destilované vody - GORO MID 300

Přístroj vyrábí destilovanou vodu, kterou získává procesem reverzní osmózy. Reverzní osmóza zachycuje nízkomolekulární látky a naopak neklade odpor volnému průtoku rozpouštědla. Kvalita vody splňuje normu ČSN ISO 3696

### 2.1.4 Fluorescenční lampa - BLB UVA Philips

Lampa se vkládá do sterilního boxu a umísťuje se na laboratorní šroubovací stojan. Intenzita záření se měří UVX radiometrem. UV lampa je vybavena černým sklem, čímž se docílí toho, že lampa emituje pouze UV záření.

Tabulka 2: BLB UVA Philips

Technické parametry	
Výkon	50 W
Vlnová délka	(300 - 400) nm
Intenzita záření	0,1 mW.cm <sup>-2</sup>
Doba expozice	4 hodiny

### 2.1.5 Fluorescenční mikroskop - Carl Zeiss Axio Imager M2M

Fluorescenční mikroskop snímkuje pomocí odraženého světla a umožňuje zobrazit fluorescenčně zbarvené bakterie. Mikroskop je vybaven kamerou AxioCam iCc1, fluorescenční lampou Colibri II a zobrazovací jednotkou. Kromě toho se skládá

z fokusačního zrcadla, čoček, filtrů a systému přivádějící objektivem světlo o určité vlnové délce ke zkoumanému objektu.

### 2.1.6 Laboratorní digitální váha - KERN EWB 620-2M

Váha se používá k přesnému odvážení sypkého prášku na přípravu živných půd. Pro udržení spolehlivosti a správnosti údajů je nutné váhu kalibrovat před každým měřením, aby nedošlo k chybě. Laboratorní váha je schopna měřit s přesností setiny gramu, ovšem ověřená hodnota má přesnost na desetiny gramu.

### 2.1.7 Měřič ultrafialového záření - model UVX-36

Radiometr je vhodný pro měření ultrafialových dlouhých vln. V praxi se využívá jako nejefektivnější ukazatel životnosti lampy, posuzuje tedy kvalitu intenzity záření. Zapisovací port umožňuje kontinuální monitorování, rozsah přístroje je možné přepnout do tří módů:

- (0 až 20) mW.cm<sup>-2</sup>, (0 až 2000) μW.cm<sup>-2</sup>, (0 až 200) μW.cm<sup>-2</sup>

V experimentech byl použit první mód, přičemž kalibrační bod přístroje byl 365 nm v rozmezí (335 až 380) nm, což odpovídalo UVA záření.

Tabulka 3: UVX model UVX-36

Technické parametry	
Napájení	9 V baterie
Čtení	2,8/sekundu
Přesnost snímače	± 5 %

### 2.1.8 Respirometr - Columbus Instruments Micro-Oxymax

Respirometr snímá koncentraci plynu, který je obsažený v uzavřeném okruhu systému. Pravidelné snímání umožňuje vypočítat aktuální a kumulativní hodnoty spotřeby a produkce. V metodě byl použit ke stanovení mikrobiálního dýchání (respektive bakteriálního metabolismu).

Micro-Oxymax má práh snímání v blízkosti  $2 \cdot 10^{-7}$  litrů za hodinu a umožňuje využít až 80 komor. Přístroj je velmi flexibilní a citlivý při kombinaci s více plyny. Standardně se snímá: kyslík, oxid uhličitý, metan, oxid uhelnatý, sirovodík a vodík.

Tabulka 4: Columbus Instruments Micro-Oxymax

Technické parametry	
Spotřeba energie	200 W
Průtoková rychlost plynu (standard)	500 cm <sup>3</sup> /min
Rozsahy plynových senzorů (standard)	CO <sub>2</sub> : (0 - 0.9)%, O <sub>2</sub> : ( 19.3 - 21.5) %
Délka vzorkování	8 minut
Jednotky plynu	mg/hod.

### 2.1.9 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázanou vazbou iCAP 6500

Spektrometr funguje na principu využívání emise a následné detekce světelného záření iontových prvků přítomných ve vzorku. Přístroj analyzuje téměř veškeré stopové prvky. Zdrojem iontů je argonová lampa. Zkoumání vzorků funguje pomocí roztokové metody. V případě použití laserové sondy, je možná analýza aerosolu z pevného vzorku.

Tabulka 5: ICP OES

Technické parametry	
Registr spektra	(165 až 900) nm
Obsahuje	Monochromátor, 2 fotonásobiče
Stanovení prvků ve stopových koncentracích	> 0,2 ppm (částice na jeden milion)

### 2.1.10 Sušička/Sterilizátor - Chirana řada HS 62A

Přístroj vysouší nebo sterilizuje laboratorní nádoby pomocí vysokotlaké páry. Zahrnuje komoru o obsahu 60 litrů, která má cirkulaci s ventilátorem. Vysoušení se uskutečňuje při 130 °C na 30 minut, naopak sterilizace se vykonává při 170 °C na

30 minut. Maximální teplota přístroje dosahuje 200 °C. Před použitím přístroje se kontroluje hladina vody v nádrži.

#### 2.1.11 Termostat – INCUCCELL

Přístroj slouží k inkubaci mikrobiologických kultur. Termostaty jsou variabilní svým objemem a teplotou s kterou pracují. Pro bakterii *E. coli* je pro inkubaci nejvhodnější teplota při 37 °C po dobu 48 hodin.

## 2.2 Software

- Matlab (The Mathworks, Inc.), s využitím knihovny Image Processing Toolbox
- Matlab, funkce: Anova1

## 2.3 Bakterie

K testování antibakteriální aktivity byla použita bakteriální populace *Escherichia coli*.

### 2.3.1 *Escherichia coli*

Kmen CCM 3954 *Escherichia coli* (Masarykova univerzita Brno – Česká sbírka mikroorganismů). Počáteční koncentrace bakterií byla  $3 \cdot 10^8$  buněk/ml.

### 2.3.2 Mc Farlandova zákalová stupnice

Mc Farlandova stupnice zadává pět stupňů zákalových řad, pomocí níž určujeme počet buněk/ml. V experimentální části byl využit první typ zákalové řady.

Tabulka 6: Určení koncentrace bakterií dle absorbance

Mc Farlandova stupnice	0,5	<b>1</b>	2	3	4
Absorbance	0,1	<b>0,257</b>	0,451	0,582	0,669

## 2.4 Pevné půdy pro kultivaci bakterií

V experimentech byla použita následující média: agar, sója, broth a fyziologický roztok. Jednotlivá média jsou dále podrobně popsána.

### 2.4.1 Nutrient Agar (kód: M001)

Používá se jako kultivační médium pro pěstování a udržení mikroorganismů. Agar je homogenní sypký prášek, který připomíná krémově žlutý, rosolovitý gel. Reakce v médiu probíhají optimálně ve vodném roztoku při 25 °C, jehož pH je  $7,4 \pm 0,2$ . Masový pepton společně s kvasničným a hovězím extraktem poskytují nezbytné sloučeniny dusíku, uhlíku, stopových prvků a vitamínů, které jsou důležité k výživě bakterií. Chlorid sodný slouží k udržení osmotické rovnováhy média. Inokulum *E. coli* připravené v agaru (50 až 100) buněk/ml bujně roste (70 %). Byl použit agar od výrobce HiMedia Laboratories.

Tabulka 7: kód: M001

	Složení (gram/litr)
Masový pepton	5
Chlorid sodný	5
Hovězí extrakt	1,5
Kvasniční extrakt	1,5
Agar	15

### 2.4.2 Soyabean Casein Digest Medium (kód: M011)

Médium se využívá pro kontrolu sterility a pro kultivaci mikroorganismů. Sója patří mezi velmi výživná média především kvůli sójovému peptonu, enzymatickému hydrolyzátu a hydrogen-fosforečnanu draselnému. Chlorid sodný udržuje osmotickou rovnováhu média. Inokulum *E. coli* připravené v sóje (50 až 100) buněk/ml bujně roste při optimálních podmínkách (30 až 35) °C během (18 až 24) hodin. Bylo použito médium od výrobce HiMedia Laboratories.



Tabulka 8: kód: M011

	Složení (gram/litr)
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	17
Sójový pepton	3
Chlorid sodný	3
Hydrogenfosforečnan draselný	2,5

### 2.4.3 Nutrient Broth (kód: M002)

Základní kultivační médium pro pěstování a udržení mikroorganismů. Používá se na výrobu inokula, k ředění bakteriální suspenze (1/500 NB) nebo k získání obvyklého počtu bakterií ( $6,7 \cdot 10^5$  až  $2,6 \cdot 10^6$ ) buněk/ml. Peptická digest ze zvířecí tkáně, kvasničný a hovězí extrakt poskytují nezbytné sloučeniny dusíku, uhlíku, stopových prvků a vitamínů, které jsou důležité k výživě bakterií. Chlorid sodný slouží k udržení osmotické rovnováhy média. Reakce média probíhají optimálně ve vodném roztoku při 25 °C, jehož pH je  $7,4 \pm 0,2$ . Inokulum *E. coli* připravené v Brothu (50 až 100) buněk/ml bujně roste. Byl použit broth od výrobce HiMedia Laboratories.

Tabulka 9: kód: M002

	Složení (gram/litr)
Peptická digest zvířecí tkáně	5
Chlorid sodný	5
Hovězí extrakt	1,5
Kvasničný extrakt	1,5

### 2.4.4 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok je bezbarvý a isotonický, protože má stejný osmotický tlak a identický počet částic. V jednom litru je obsaženo 8,5 gramů chloridu sodného, což odpovídá tomu, že je v 1 ml obsaženo 8,5 mg NaCl ( $\text{Na}^+ = 154$ ;  $\text{Cl}^- = 154$ ) mmol/l.

## **2.5 Příprava vzorku před testováním**

Před samotným měřením je nutná příprava laboratorního nádobí, testovacích sklíček, živných půd a inokula.

### **2.5.1 Příprava sklíček**

V experimentální části byly použity kontrolní a fotoaktivní vzorky. Fotoaktivním vzorkem bylo testovací sklíčko, na které byl nanesen prekurzor Cleanox metodou Dip coating (viz Kapitola II3.8.1). Kontrolním vzorkem bylo obyčejné testovací sklíčko.

Sklíčka byla nařezána diamantovou pilou IsoMet 1000. Do nálevky, která je umístěná pod diamantovou pilou, se nalilo požadované množství vody, což odpovídá zhruba 5 mm k ponoření pily. Všechna testovací sklíčka byla nařezána na rozměry (2,5 × 2,5) cm.

### **2.5.2 Inokulum E. coli**

Kapsle E. coli (CCM 3954) byla rozpuštěna v tekutém živném médiu (NB) a byla kultivována při 37 °C po dobu (24-48) hodin. Posléze byla E. coli očkovaná mikrobiologickou kličkou na tuhé médium (PCA agar Biorad) a kultivována při 37 °C po dobu (24 – 48) hodin. Narostlé kolonie byly přeneseny mikrobiální kličkou do tekutého média (NB). Ve vzniklém inokulu byl proveden Mc Farlandův zákal č. 1, což odpovídá absorbanci = 0.257, pro dosažení příslušného počtu bakterií (bakterie/ml). S inokulem je ideální pracovat ihned po jeho přípravě.

### **2.5.3 Sterilizace**

Na sterilizaci byl použit sterilizátor Chirana (viz Obrázek 1). Laboratorní nádobí bylo vysterilizováno při 170 °C na 30 minut.



Obrázek 1: Sterilizátor Chirana řada HS 62A (Zdroj: autor).

#### 2.5.4 Příprava živných pūd

Média (viz příprava) byla vařena v autoklávu UNISTERI HP (viz Obrázek 2) při 121 °C po dobu 15 minut. Média poté byla zchlazena na 25 °C a skladována na temném a studeném místě.



Obrázek 2: Autokláv: UNISTERI HP (Zdroj: autor).

#### Příprava:

- **Fyziologický roztok:** (4,25 g NaCl a 0,5 l destilované vody)
- **Sója:** (7,5 g sóji a 250 ml destilované vody)
- **Živný agar:** (7 g agaru a 250 ml destilované vody)
- **Nutrient Broth:** (6,25 g brothu a 250 ml destilované vody)

### 3 Metodika výzkumu

V této části budou u jednotlivých metod podrobněji popsány postupy měření.

#### 3.1 Hodnocení respirační aktivity

Respirometrická metoda ověřuje metabolickou aktivitu bakteriální populace. Za užití přístroje Columbus Instruments Micro-Oxyma (viz Obrázek 3) se při ní vyhodnocuje koncentrace kyslíku, oxidu uhličitého a methanu. Vzorky byly připraveny dle normy ČSN EN ISO 9408, která stanovuje jakost vod, k vyhodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí a určení spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru.

Do Fischerovy reagenční lahve o objemu 100 ml bylo dávkováno 10 ml vzorku. Do vzorku byl vložen testovaný povrch s fotoaktivním nátěrem a obyčejné sklíčko (kontrola). Vzorky byly umístěny pod UV lampu a do tmy. Celý proces byl v průběhu 40 hodin měřen kontinuálně a v daných intervalech byly vyhodnocovány koncentrace plynů.

**Vzorek zahrnuje:** fyziologický roztok; bakteriální suspenzi *E. coli* ( $1MF = 0.267$ ); 2 g/l glukózy



Obrázek 3: Respirometr Columbus Instruments Micro-Oxyma (Zdroj: autor).

### **3.2 Metoda Live/Dead® BacLight™**

Metoda stanovuje životaschopnost bakterií s použitím fluorescenčního mikroskopu ZEISS Axio Imager.M2, díky níž lze snadným barevným rozbořem rozpoznávat a klasifikovat vitalitu bakteriálních populací. Metoda funguje na principu průniku fluorescenčního barviva přes cytoplazmu. Pomocí zbarvení buněčných populací se identifikuje případné narušení buněčné membránové integrity. Umírající buňka má zhoršenou celistvost membrány, označuje se za mrtvou a zbarví se červeně. Buňka s nenarušenou integritou je životaschopná a zbarví se zeleně.

Interakce vzorků a mikroorganismů byla uskutečněna pod UV lampou a ve tmě. Jako povrch byly využity fotoaktivní a kontrolní vzorky. Na každý vzorek byly naneseny 3 kapky (30  $\mu$ l) bakteriální suspenze *E. coli*.

Nejprve bylo provedeno nulté měření, při kterém vzorky na rozdíl od ostatních nebyly ani ve tmě, ani pod UV lampou. Z každého vzorku se z první kapky odebralo 5  $\mu$ l suspenze, která byla vzápětí smíchána s 3  $\mu$ l fluorescenčního barviva, a po dobu 15 minut byly vzorky uchovány v temnu. Posléze se provedla analýza Live/Dead fluorescenčním mikroskopem a spočítala se viabilita bakterií. Po uplynutí dané doby se u ostatních kapek postupovalo stejným způsobem po již přesně daných časových intervalech.

### **3.3 Stanovení antibakteriální aktivity materiálů polovodičových fotokatalyzátorů, ISO 27447**

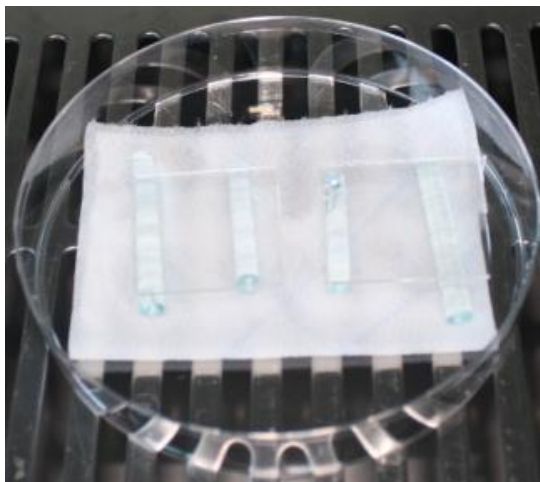
#### **3.3.1 Příprava metody**

Vzorky byly testovány ve tmě a pod UV lampou. UV lampa byla vložena do sterilního boxu a měla intenzitu záření 0,1 mW.cm<sup>-2</sup> (změřená vzdálenost činí přibližně 12,5 cm).

Do každé Petriho misky (viz Obrázek 4) se vložil na dno filtrační papír, který byl navlhčený destilovanou vodou. Na zvlhčený filtrační papír byly poskládány skleněné tyčinky, na které byl umístěn testovací vzorek. Na každý testovací vzorek bylo

naneseno 150  $\mu$ l bakteriální populace *E. coli* a suspenze byla rovnoměrně rozprostřena po celém vzorku sterilní skleněnou hokejkou.

Celkem bylo připraveno pět Petriho misek. Tři kontrolní a dva fotoaktivní vzorky. Měření bylo provedeno duplicitně.



Obrázek 4: Schéma přípravy metody (ISO 27447). Na obrázku je vzorek (+ duplicitní vzorek) pod UV lampou (Zdroj: autor).

Jeden kontrolní a jeden fotoaktivní vzorek byly vloženy pod UV lampu, stejně tak byly vzorky nachystány do tmy. Měření probíhalo po dobu (4 až 6) hodin. Jeden kontrolní vzorek (Přímý oplach) byl ihned zpracován.

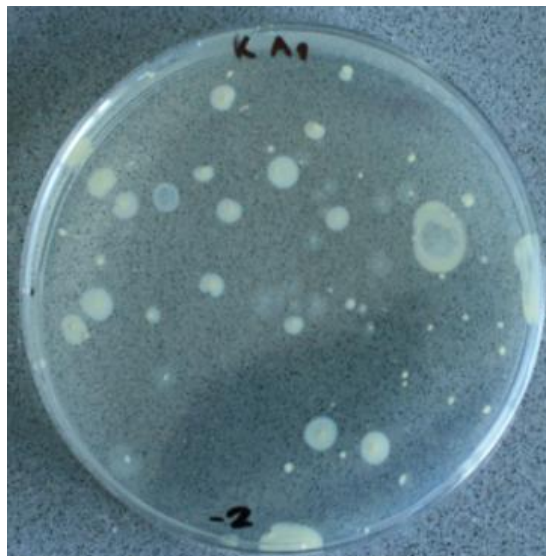
Po stanoveném čase byla z těchto Petriho misek odebrána testovací sklíčka, která byla vystavena tmě a umístěna pod UV lampou. Tato sklíčka byla vložena do sóji (10 ml) a byla vytřepána na vortexu (z důvodu dobrého vytřepání bakteriální suspenze do sóji). Dále bylo provedeno desetinásobné ředění bakteriální suspenze. Postup ředění probíhal následovně: bylo odebráno pipetou 1 ml roztoku ze sóji do první zkumavky, čímž pokračovala série 5 ředění. Vyšší řád ředění není potřeba, protože bakteriální inhibice je značná již při (-5). Petriho misky byly zality rozehrátým agarem a ponechány k zatuhnutí. Inkubační doba v termostatu byla 48 hodin při 37 °C.

### 3.3.2 Počítání kolonií

Po uplynutí inkubační doby byly z termostatu odebrány vzorky. Kolonie, které jsou těžce rozeznatelné (nepřehledné, slité, vzájemně přerostlé), se nazývají přemnožené. Přemnožené kolonie se nepočítají. Pozornost se soustředí pouze na takové vzorky, které jsou dobře počítatelné. Ideální počet kolonií odpovídá (30 až 300) buněk/ml.



Obrázek 6 Přemnožené bakterie *E. coli*  
(Zdroj: autor)



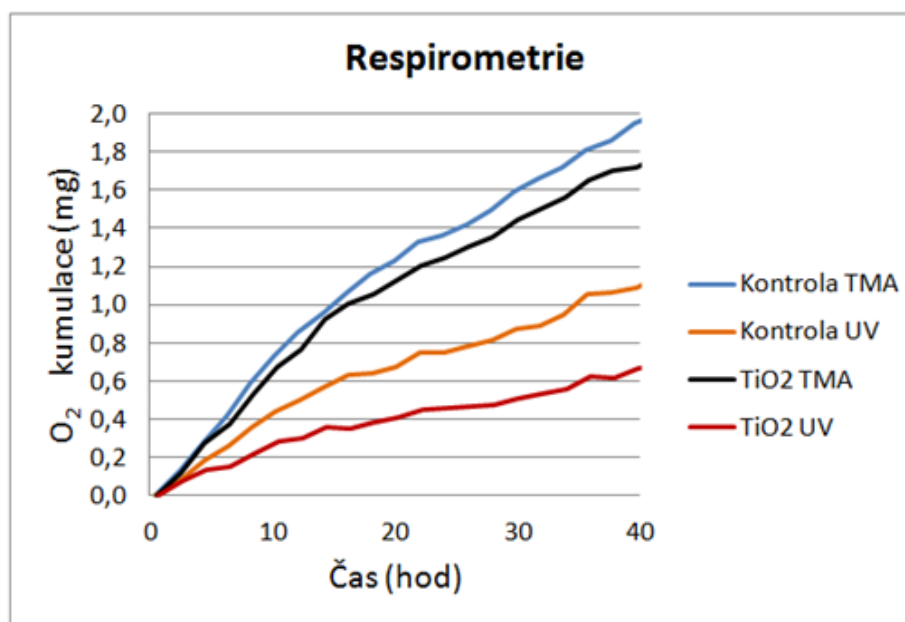
Obrázek 5 Ideální počet *E. coli*  
(Zdroj: autor)

## 4 Analýza výzkumných dat

V kapitole jsou prezentovány výsledky z respirometrického měření, Live/Dead metody, testování antibakteriální aktivity podle normy ISO 27447 a Jednofaktoriální ANOVY. Kromě těchto metod se doplňkově testovala analýza louhování oxidu titaničitého a hodnotil se povrch fotoaktivního filmu.

## 4.1 Hodnocení respirační aktivity

U grafu (viz Graf 1) z respirometrického měření se posuzuje vztah kumulace kyslíku (v jednotkách mg) k bakteriální populaci *E. coli* v průběhu 40 hodin. Čím níže se nalézá křivka respirace, tím více je utlumen metabolismus bakterií nebo je v daném vzorku menší počet bakteriální populace.



Graf 1: Respirometrie

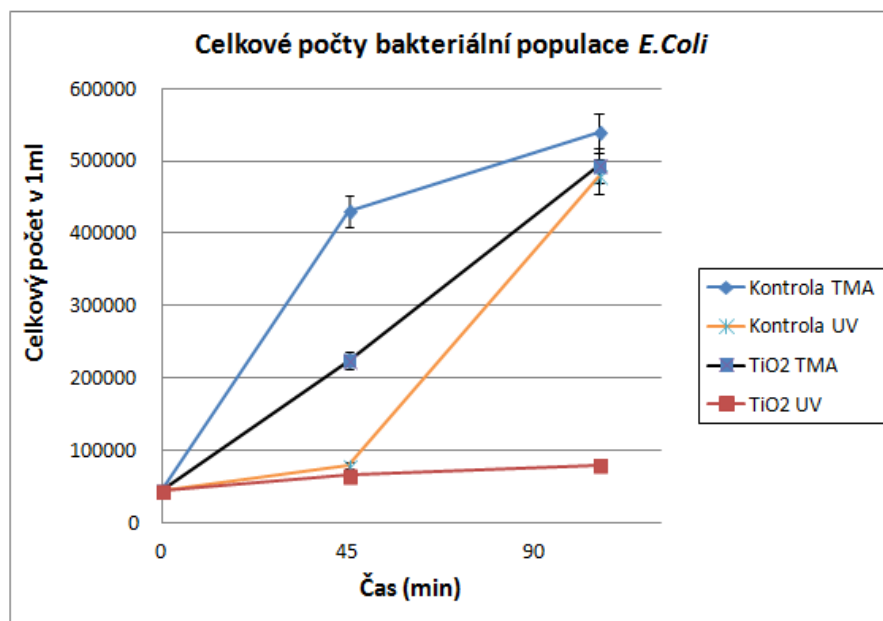
Největší metabolická aktivita se projevila ve tmě. Modrá a černá křivka se liší pouze zanedbatelně. U UV záření byl fotoaktivní vzorek červené křivky o 38 % níže než kontrolní vzorek reprezentovaný oranžovou křivkou. Nejnižší červená křivka respirace byla u fotoaktivního nátěru (UV lampa). U křivek reprezentujících vzorky uchované ve tmě (černá a modrá) můžeme prokazatelně vidět, že fotoaktivní povrch potřebuje k tomu, aby dobře fungoval, právě UV světlo.

Dle výsledku z respirometrie můžeme říct, že UV záření společně s oxidem titaničitým má inhibiční vliv na bakterie. Graf spotřeby kyslíku byl v rámci směrodatné odchylky 2 %. Měření proběhlo duplicitně, a tudíž můžeme konstatovat, že výsledek byl v rámci 10 % chyby shodný.



## 4.2 Metoda Live/Dead

V grafu (viz Graf 2) byl zaznamenán celkový počet všech bakterií (mrtvé i živé). První měření všech vzorků bylo nulté. Vzorky byly měřeny po opakujícím se intervalu (0, 45, 105) min. V grafu byl zaznamenán maximální počet bakteriální populace *E. coli* ve tmě na obyčejném sklíčku. Minimální počet bakterií byl naměřen na fotoaktivním sklíčku, na které působila UV lampa.



Graf 2: Celkové počty bakteriální populace *E. coli*

Rozdíl fotoaktivního vzorku (černá křivka) od kontrolního (modrá křivka), byl v prostředí tma o 8 % níže. Pod UV lampou byl se zřetelným výsledkem fotoaktivní vzorek (červená křivka) o 84 % níže než kontrolní vzorek (oranžová křivka). Graf celkového výskytu bakteriální populace byl v rámci směrodatné odchylky 5 %.

## 4.3 Stanovení antibakteriální aktivity materiálů polovodičových fotokatalyzátorů, ISO 27447

Vyhodnocení metody (ISO 27447) a Jednofaktoriální ANOVY z naměřených dat (viz tab. 10, 11, 12 a 13).

#### 4.3.1 Vyhodnocení antibakteriální aktivity

Cílem metody bylo prokázat fotokatalytickou antibakteriální účinnost fotokatalyzátoru za simulace intenzity záření denního světla. K výpočtu byly použity průměry z naměřených dat (buněk/ml).

Tabulka 10: Měření č. 1

Měření A	Ředění -1	Ředění -2	Ředění -3	Ředění -4	Ředění -5
Přímý oplach	přerostlé	přerostlé	363	42	6
TiO <sub>2</sub> kontrola 1	přerostlé	824	122	9	1
TiO <sub>2</sub> kontrola 2	přerostlé	844	114	9	1
TiO <sub>2</sub> 1	562	39	4	0	0
TiO <sub>2</sub> 2	71	6	1	0	0
Tma kontrola	přerostlé	696	64	5	0
Tma 1	přerostlé	656	61	6	0
Tma 2	přerostlé	301	28	2	0

Tabulka 11: Měření č. 2

Měření B	Ředění -1	Ředění -2	Ředění -3	Ředění -4	Ředění -5
Přímý oplach	1576	přerostlé	363	42	6
TiO <sub>2</sub> kontrola	408	49	7	4	0
TiO <sub>2</sub> 1	76	8	2	0	0
TiO <sub>2</sub> 2	59	6	1	0	0
Tma kontrola	674	86	6	0	0
Tma 1	879	101	10	1	0
Tma 2	621	67	9	1	0

Tabulka 12: Měření č. 3

Měření C	Ředění -1	Ředění -2	Ředění -3	Ředění -4	Ředění -5
Přímý oplach	přerostlé	přerostlé	1084	150	11
TiO <sub>2</sub> kontrola 1	přerostlé	764	79	6	3
TiO <sub>2</sub> kontrola 2	přerostlé	2384	288	25	2
TiO <sub>2</sub> 1	452	57	6	2	0
TiO <sub>2</sub> 1	352	40	7	3	0
Tma kontrola	přerostlé	přerostlé	6	0	0
Tma 1	přerostlé	přerostlé	10	1	0
Tma 2	přerostlé	přerostlé	9	1	0

Tabulka 13: Měření č. 4

Měření D	Ředění -1	Ředění -2	Ředění -3	Ředění -4	Ředění -5
Přímý oplach 1	přerostlé	přerostlé	148	18	1
Přímý oplach 2	přerostlé	přerostlé	279	27	2
TiO <sub>2</sub> kontrola 1	přerostlé	431	43	5	0
TiO <sub>2</sub> kontrola 2	přerostlé	421	40	4	0
TiO <sub>2</sub> 1	78	13	3	0	0
TiO <sub>2</sub> 2	49	4	1	0	0
Tma kontrola 1	přerostlé	642	57	9	1
Tma kontrola 2	přerostlé	675	67	7	0
Tma 1	přerostlé	220	24	3	0
Tma 2	přerostlé	229	25	5	0

Naměřená data (viz tab. 10, 11, 12 a 13) byla matematicky vyhodnocena podle následujících vzorců:

$$\Delta R = \log \frac{Bl}{Cl} - \log \frac{Bd}{Cd}$$

$$RL = \log \frac{Bl}{Cl}$$

Jestliže platí nerovnost ( $\log \frac{\text{kontrola tma}}{\text{fotoaktivní nátěr tma}} > 0$ ), pak bylo v kontrolním vzorku více E. coli (buněk/ml) než ve fotoaktivním vzorku. Tím by bylo potvrzeno, že vzorky potřebují k inaktivaci UV světlo. Oproti tomu, pokud by platila nerovnost ( $\log \frac{\text{kontrola tma}}{\text{fotoaktivní nátěr tma}} < 0$ ), pak by bylo více E. coli (buněk/ml) na fotoaktivním vzorku, a tedy by se prokázalo, že antibakteriální účinnost probíhá i za tmy.

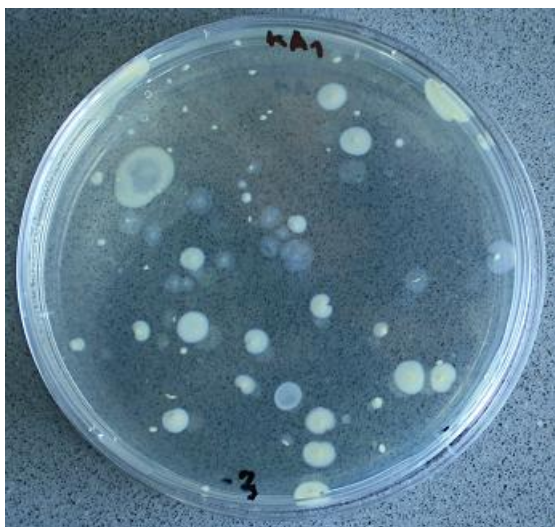
- **RL**: fotokatalytická antibakteriální činnost po UV ozáření (0,1 mW.cm<sup>-2</sup>)
- **ΔR**: fotokatalytická antibakteriální účinnost po UV ozáření s přihlédnutím na počet inkubovaných bakteriální ve tmě
- **(A-D)**: udává jednotlivá měření
- **B<sub>i</sub>, C<sub>i</sub>, B<sub>d</sub>, C<sub>d</sub>**: zkratky jsou vysvětlené, viz Kapitola. II5.1.5 )

Tabulka 14: Posouzení účinnosti fotokatalyzátoru

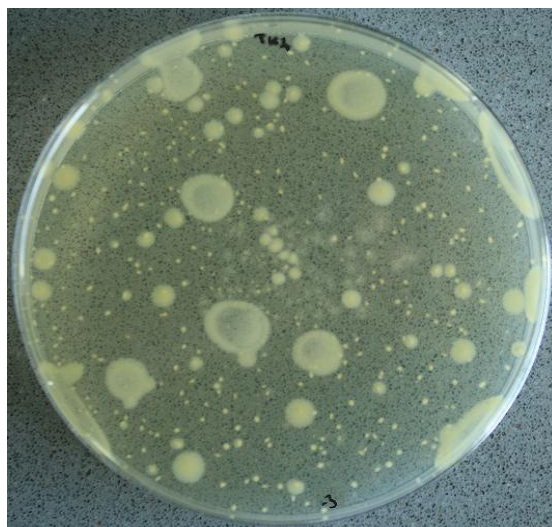
Escherichia coli 0,1 mW.cm <sup>-2</sup> po 4 hodiny		
	RL	ΔR
A	1,7	1,5
C	1,5	1,3
D	1,3	0,9
Průměr	1,50	1,23
Směrodatná odchylka	0,20	0,31

(pozn. z měření: u měření typu B vznikl statisticky vychýlený výsledek, nebyl započten do průměru odchylky RL = 0,8; ΔR = 0,8)

Z tabulky (viz tab. 14) je zřejmé, že vzorky potřebují k inaktivaci bakterií UV světlo. Nejefektivněji probíhala inaktivace na fotoaktivním ozářeném vzorku. Avšak úbytek bakterií byl i u ozářeného kontrolního vzorku oproti přímému oplachu. Je to z toho důvodu, protože bakterie neměly přirozené prostředí a světlo jim vysoušelo vlhký roztok, ve kterém byly umístěné.



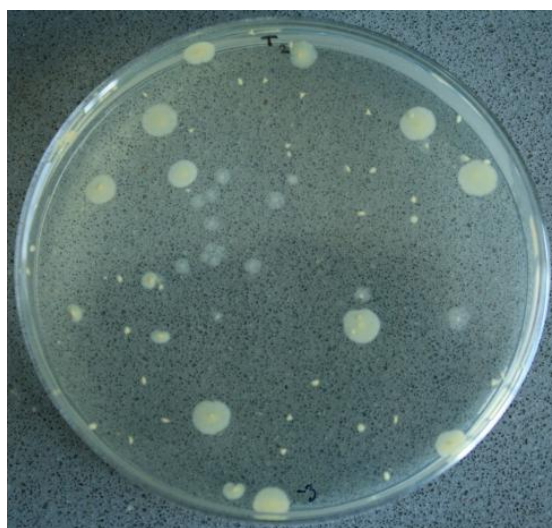
Obrázek 7: Kontrola pod UV lampou (Zdroj: autor)



Obrázek 8: Kontrola ve tmě (Zdroj: autor)



Obrázek 9: Fotoaktivní vrstva pod UV lampou (Zdroj: autor)



Obrázek 10: Fotoaktivní vrstva ve tmě (Zdroj: autor)

Dále bylo provedeno srovnání vzorků pro stanovení úbytku kolonií ve tmě a pod UV lampou. Byly vybrány vzorky ze třetího ředění. Na vzorcích umístěných pod UV lampou můžeme pozorovat, že na fotoaktivní vrstvě (viz Obrázek 9) byl zřetelný úbytek kolonií oproti kontrolnímu vzorku (viz Obrázek 7). Na rozdíl od vzorků ve tmě, zde nastal u fotoaktivního vzorku (viz Obrázek 10) menší úbytek kolonií vůči kontrolnímu vzorku (viz Obrázek 8).

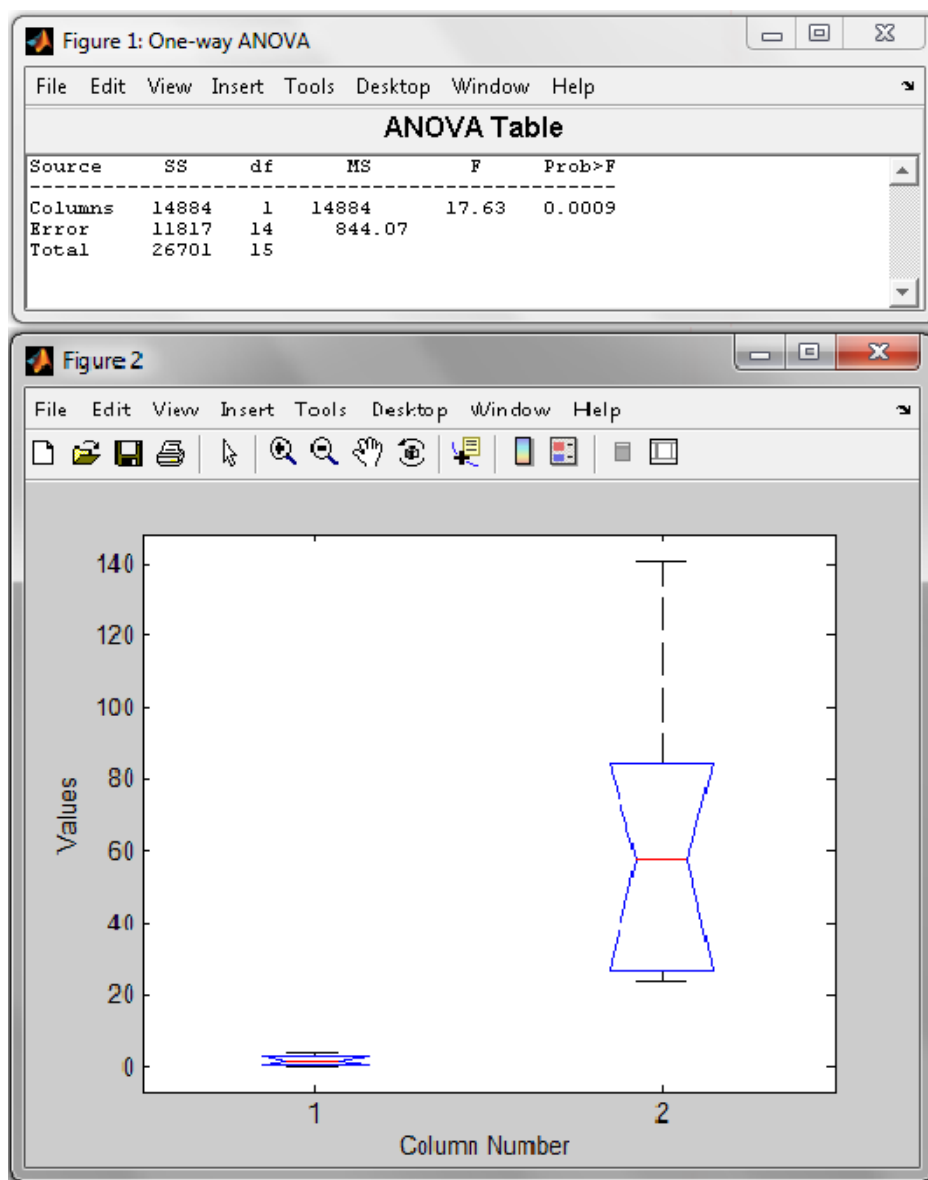
Z dosažených výsledků můžeme konstatovat závěr, že největší inhibice bakterií nastala u ozářeného fotoaktivního vzorku (viz Obrázek 9) a nejmenší u kontrolního vzorku ve tmě (viz Obrázek 8). Maximální inhibice se dosahuje při ozáření fotoaktivního vzorku světlem o odpovídající vlnové délce.

#### **4.3.2 Jednofaktoriální ANOVA**

Pro zjištění statisticky významného rozdílu naměřených výsledků pro vzorky pod UV lampou a ve tmě byla použita statistická metoda Jednofaktoriální ANOVA. Na základě naměřených hodnot jsme se pokusili zjistit, zda střední hodnoty nárůstu kolonií závisí na ozáření. Byla použita data z třetího ředění (fotoaktivní vzorky ze tmy a pod UV lampou).

K nalezení závislosti byla stanovena hypotéza  $H_0$ : jestliže se jednotlivé průměry skupin rovnají, tedy data ve tmě korespondují s daty pod UV lampou, jsou si skupiny podobné a nulová hypotéza se přijímá (testovací kritérium  $<$  kritická hodnota). V opačném případě se dané skupiny liší, čímž se nulová hypotéza zamítá a přijímá se alternativní hypotéza  $H_1$  (testovací kritérium  $>$  kritická hodnota).

Jednofaktoriální ANOVA byla vyhodnocena v prostředí MATLAB s výsledkem: testovací kritérium = 17,6 a kritická hodnota = 4,6. Testovací kritérium je větší než kritická hodnota a tedy lze přijmout alternativní hypotézu  $H_1$  „dané skupiny se statisticky liší“. Z grafu (viz Graf 3) plyne, že největší úbytek bakterií byl u fotoaktivních vzorků pod UV lampou.

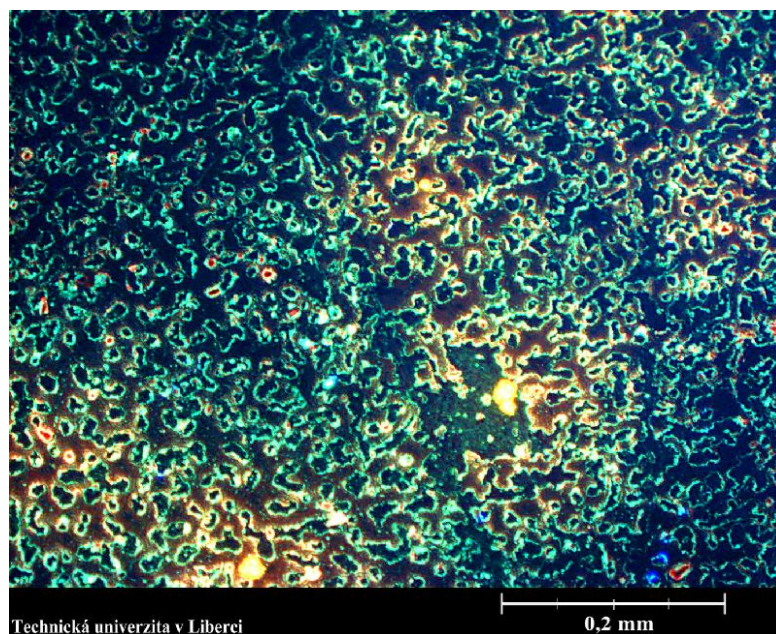


Graf 3: Jednofaktoriální ANOVA v MATLABU: Vzorky s fotoaktivním nátěrem se liší v situacích světlo (menší) a tma (větší), (Zdroj: autor).

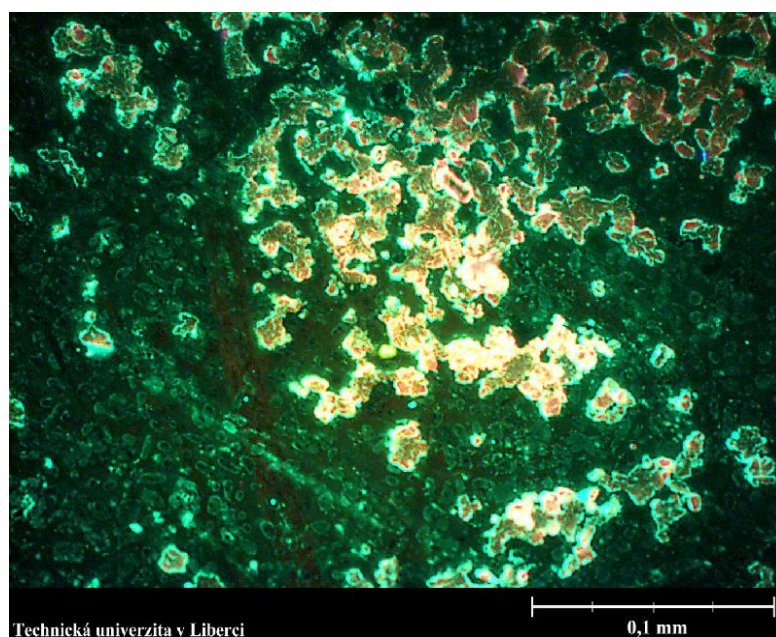
#### 4.4 Charakteristika povrchu fotoaktivního filmu

Na snímcích (viz Obrázek 11, Obrázek 12) jsou vyobrazené povrchy fotoaktivních vrstev v různém zvětšení prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu ZEISS Axio Imager.M2. Cílem bylo pokrýt rovnoměrně sklíčko vrstvou oxidu titaničitého metodou Dip coating. Avšak jak ukazují fotky, homogenního pokrytí nebylo dosaženo.





Obrázek 11 A) Fotoaktivní vrstvy potažené na sklíčkách metodou Dip coating (Zdroj: autor).



Obrázek 12 B) Fotoaktivní vrstvy potažené na sklíčkách metodou Dip coating (Zdroj: autor).



## 4.5 Analýza louhování oxidu titaničitého

Vzhledem k negativním názorům na používání nanomateriálů, vyplývajících z jejich rizik (jako je například nekontrolovatelný únik do okolí, viz Kapitola III.1), byl vzorek s oxidem titaničitým analyzován optickou emisní spektrometrií. Vzorek byl nanesen metodou Dip coating a po dobu jednoho týdne byl louhován ve fyziologickém roztoku.

Neprokázalo se (viz tab. 15), že by se oxid titaničitý uvolňoval do fyziologického roztoku. Experiment potvrdil dlouhodobou účinnost a mechanickou stabilitu vrstev oxidu titaničitého v pozorovaném časovém intervalu.

Tabulka 15: Analýza ICP

	(Ti mg/l)
Fyziologický roztok bez TiO <sub>2</sub> měření č. 1	< 0,005
Fyziologický roztok bez měření č. 2	< 0,005
Fyziologický roztok s TiO <sub>2</sub> měření č. 1	< 0,005
Fyziologický roztok s TiO <sub>2</sub> měření č. 2	< 0,005

## 5 Analýza výzkumných cílů a předpokladů

V literární rešerši bylo zkoumáno možné využití nanočástic v biologických aplikacích a jejich problematika. Ve výzkumné části se hodnotila interakce oxidu titaničitého s bakteriální populací E. coli. Testovala se antibakteriální aktivita. Jako nejvhodnější metoda byla shledána norma ISO 27447. V empirické části byly dále prověřeny hypotézy metodou Jednofaktoriální ANOVA prostřednictvím kvantitativního výzkumného šetření. Cíle práce byly tímto splněny.

## 6 Diskuze

V práci se zjišťovala antibakteriální aktivita bakteriální populace *E. coli*. Byly hodnoceny fotoaktivní vzorky vůči kontrolám ve tmě a pod UV lampou. Respirometrickou metodou se testoval bakteriální metabolismus. Bylo prokázáno, a to i při duplicitním měření, že nejnižší metabolická aktivita byla zaznamenána u ozářeného fotoaktivního vzorku. V případě prostředí ve tmě se zjistilo, že fotoaktivní povrch potřebuje ke své aktivaci světlo. V metodě Live/Dead se hodnotil celkový počet bakteriální populace. Byl zjištěn zvýšený počet *E. coli* za tmy, ale v případě kdy byl fotoaktivní vzorek osvětlen, byl počet *E. coli* nižší. V metodě podle normy ISO 27447 bylo ověřeno, že aby oxid titaničitý fungoval antibakteriálně, je nutné pracovat za přítomnosti UVA záření. Statistickou metodou Jednofaktoriální ANOVA byla zamítnuta hypotéza, že jsou střední hodnoty naměřených dat ve tmě a pod UV lampou srovnatelné, a naopak bylo prokázáno, že se střední hodnoty naměřených dat (fotoaktivních vzorků) liší. V kapitole Analýza povrchu fotoaktivního filmu se hodnotilo, zda je vhodná nanášecí metoda Dip coating. Bylo zjištěno, že se povrchy testovaných sklíček nepodařilo pokryt zcela homogenně. Lze uvažovat, zda nezvolit jinou metodu nanášení. V posledním experimentu se zkoumalo uvolňování oxidu titaničitého. Potvrdila se dlouhodobá účinnost a mechanická stabilita v pozorovaném časovém intervalu.

Pokusíme se porovnat výsledky práce se studiemi zabývající se fotokatalytickou aktivitou oxidu titaničitého. Ve výzkumu podle Erdurala a Bolukabasika se prokázala maximální antibakteriální aktivita na fotoaktivních vzorcích pod UV lampou. Naproti tomu byla minimální na vzorcích umístěných ve tmě a na kontrolních vzorcích pod UV lampou. [34] Další zmíněná studie podle Mika a Fishera se zaměřovala na nedopovanou fotokatalýzu oxidu titaničitého. Tato studie prokázala, že oxid titaničitý urychluje zprostředkovanou sluneční inaktivaci mikroorganismů a degraduje organické a anorganické nečistoty. [18]

## 7 Návrh doporučení pro praxi

Vrstva oxidu titaničitého se nanáší jednoduchou cestou (nátěrem, nástřikem), podobně jako nátěrové barvy. Fotoaktivní nátěr se aplikuje na stěny nebo na strop v interiéru, ale i v místnostech bez oken, kde se používají fluorescenční lampy. Vrstva oxidu titaničitého je dlouhodobě stabilní, zdravotně nezávadná a nevyžaduje údržbu. Pokud je tato vrstva oxidu titaničitého ale mechanicky poškozena, snižuje se její účinnost.

Doporučovala bych, aby byla metoda využita především ve zdravotnických zařízeních. Fotoaktivní nátěr je vhodný v místech rizika šíření nákaz nemocí vzduchem. Nátěr je přínosný např. pro lidi trpící nemocemi bakteriálního původu nebo sníženou imunitou. Kromě odstraňování nečistot je nátěr vhodný i k eliminaci vzniklého kouře a zápachu, např. při elektrochirurgii.

Daná studie fotoaktivních filmů by se nadále mohla rozvíjet např. testováním stability naneseného filmu během několika měření, použitím dalších nanášecích technik nebo podrobným probádáním dopování fotokatalyzátoru oxidu titaničitého.

## IV Závěr

Cílem práce bylo prokázat fotokatalytickou antibakteriální účinnost fotokatalyzátoru prostřednictvím simulace denního světla. Fotokatalyzátorem byl nanokompozit (oxidu titaničitého/oxidu křemičitého), který se pomocí metody Dip coating nanese v podobě tenkého filmu na obyčejné sklíčko. V experimentech se testovaly fotoaktivní vrstvy vůči kontrolním vzorkům, pod UV lampou a ve tmě (při absenci světla). UV lampa vyzařovala záření o intenzitě  $0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$  při vlnové délce 365 nm. Testovala se bakteriální populace *E. coli* (o absorbanci 0.257). Testování antibakteriální aktivity proběhlo v souladu s normou ISO 27447.

Vzhledem ke zjištěným výsledkům z testovaných metod a z prověřených studií můžeme prokazatelně říci, že simulované denní světlo spolu s fotoaktivní vrstvou má vliv na úbytek bakteriální populace *E. coli* o 78 %. Cíle bakalářské práce byly splněny.

## V Seznam použité literatury

- [1] LI, Y. -S., & CHURCH, J. S. (2014). *Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials*. Journal of Food and Drug Analysis, 22(1), 29-48. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.003
- [2] PAVEL, HOUSER. SCIENCEWORLD. *Nanočástice umožní efektivní čištění vody solární energií* [online]. 2013 [cit. 2015-07-01]. Dostupné z: Dostupné z: Dostupné z: <http://www.scienceworld.cz/technologie/nanocastice-umozni-efektivni-cisten-vody-solarni-energii/>
- [3] PAVEL, HOUSER. SCIENCEWORLD. *Nanotechnologie v ČR – praktické aplikace*: [online]. 2006 [cit. 2015-07-01]. Dostupné z: <http://www.scienceworld.cz/neziva-priroda/nanotechnologie-v-cr-prakticke-aplikace-1236/>
- [4] LI, Q., MAHENDRA, S., LYON, D. Y., BRUNET, L., LIGA, M. V., LI, D., & ALVAREZ, P. J. J. (2008). *Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications*. Water Research, 42(18), 4591-4602. doi:10.1016/j.watres.2008.08.015
- [5] LV, X., WANG, P., BAI, R., CONG, Y., SUO, S., REN, X., & CHEN, C. (2014). *Inhibitory effect of silver nanomaterials on transmissible virus-induced host cell infections*. Biomaterials, 35(13), 4195-4203. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.01.054
- [6] KUNZMANN, A., ANDERSSON, B., THURNHERR, T., KRUG, H., SCHEYNIUS, A., & FADEEL, B. (2011). Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1810(3), 361-373. doi:10.1016/j.bbagen.2010.04.007
- [7] ZHANG, X.-Q., XU, X., BERTRAND, N., PRIDGEN, E., SWAMI, A., & FAROKHZAD, O. C. (2012). *Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine*. Advanced Drug Delivery Reviews, 64(13), 1363-1384. doi:10.1016/j.addr.2012.08.005

- [8] FILIPOVÁ, KUKUTSCHOVÁ, MAŠLÁŇ. *Rizika nanomateriálů*. 1. vyd. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2012, s. 26-34. ISBN 978-80-244-3201-4.
- [9] JOMINI, S., LABILLE, J., BAUDA, P., & PAGNOUT, C. (2012). Modifications of the bacterial reverse mutation test reveals mutagenicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and byproducts from a sunscreen TiO<sub>2</sub>-based nanocomposite. *Toxicology Letters*, 215(1), 54-61. doi:10.1016/j.toxlet.2012.09.012
- [10] NOVOTNÁ, Bc. Michaela. *Fotokatalytická aktivita tištěných vrstev oxidu titaničitého.* Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. on-line s. 8 [cit. 2015-04-17]. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=13514](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=13514)
- [11] *Katalýza* [online]. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. [cit. 2015-07-01]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/fch/prikladnik/prikladnik/p.8.7.html>
- [12] GÄRTNER, Harald. *Kompendium chemie: vzorce, pravidla a principy - úlohy a jejich řešení - periodická soustava prvků - výkladový slovník*. Vyd. 1. Praha: Euromedia Group - Knižní klub, 2007, 542 s. Universum (Knižní klub). ISBN 978-80-242-2012-3.
- [13] KULIČ, Jiří. *Heterogenní katalýza*. Pardubice: Vysoká škola chemicko-technologická v Pardubicích, 1982. č.21.514/79.
- [14] ZBOŘILOVÁ, Bc. Zdeňka. *Fotokatalytická aktivita hybridních vrstev oxidu titaničitého a křemičitého* [online]. Vysoké učení technické v Brně, 2013 [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: [https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/20869/DP\\_Z\\_Zborilova.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/20869/DP_Z_Zborilova.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [15] FUJISHIMA, Akira, Kazuhito HASHIMOTO a Toshiya WATANABE. *TiO<sub>2</sub>Fotokatalýza: základy a aplikace*. 1. vyd. Praha: Silikátový svaz, 2002. ISBN 80-903113-3-4.
- [16] LAJČÍKOVÁ, a PEKÁREK. *UV záření a jeho vliv na zdraví* [online]. Státní zdravotní ústav, Praha, 2009 [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://apps.szu.cz/svi/hygiena/archiv/h2009-2-05-full.pdf>

- [17] SYNNOTT, Damian W. a Suresh C. PILLAI. *Applied catalysis: Anti-bacterial activity of indoor-light activated photocatalysts*. Amsterdam: Elsevier, 2013, s. 106-111. ISBN 09263373. ISSN 1873-3883.
- [18] FISHER, Mike B. a Suresh C. PILLAI. *Applied catalysis: Nitrogen and copper doped solar light active TiO<sub>2</sub> photocatalysts for water decontamination*. Amsterdam: Elsevier, 2013, s. 8-13. ISBN 09263373. ISSN 1873-3883.
- [19] SEKEROVÁ, Bc. Kateřina. *Příprava a vlastnosti hybridních vrstev oxidu titaničitého a křemičitého*. [online]. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, ÚSTAV fyzikální a spotřební chemie., 2013 [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: [http://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=62811](http://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=62811)
- [20] SEKEROVÁ, Kateřina. *Porézní vrstvy oxidu titaničitého*. [online]. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, ÚSTAV fyzikální a spotřební chemie., 2011 [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=36473](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=36473).
- [21] HERMAN, B. a V.E.C FROHLICH. *Basic Concepts in Fluorescence* [online]. [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>
- [22] *Vyukový portál: Ústav biologie Lékařské fakulty, Olomouc: Fluorescenční barvivo*: [online]. [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/Fluorescencni%20barvivo.htm>
- [23] HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2001, s. 381, s. 255. ISBN 80-902896-1-4.
- [24] *Micro-Oxymax Layman's Guide to Measurement Principles: Columbus Instruments* [online] [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://www.columbusinstruments.com/PDF-Manuals/Micro-Oxymax/Primer.pdf>.

- [25] MUSILOVÁ, Petra. *Možnosti stanovení germania v potravinách: ICP OES* [online]. Brno, 2009 [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=16226](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=16226)
- [26] ISO 27447: Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics): Test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materials. 2009.
- [27] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. *Kompendium statistického zpracování dat: metody a řešené úlohy*. Vyd. 2., přeprac. a rozš. Praha: Academia, 2006, s. 982. ISBN 80-200-1396-2.
- [28] ZVÁRA, Karel a Josef ŠTĚPÁN. *Pravděpodobnost a matematická statistika*. 5. vyd. Praha: Matfyzpress, 2012, s. 230. ISBN 978-80-7378-218-4.
- [29] *Analýza rozptylu (ANOVA): Multimediální pomůcky na VFU - rozcestník* [online]. 2012 [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/statpotr/POTR/Teorie/Predn3/ANOVA.htm>
- [30] BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
- [31] RULÍK, M. a kol. *Mikrobiální biofilmy*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. 447 s., s. 57-58. ISBN 978-80-244-2747-8
- [32] PHARMA-REPORTS. *Klinicky významné bakterie*. 1. Vyd. Praha: Triton, 2012. 123 s., s. 47, 65, 90-92. ISBN 978-80-7387-588-6
- [33] CAREY, Roberta. SCHUSTER, Mindy. MCGOWAN, Karin. *Lékařská mikrobiologie v klinických případech*. 1.vyd. Praha: Triton, 2011. 321 s., s. 26-27. ISBN 978-80-7387-480-3
- [34] ERDURAL Beril a Ufkuk BOLUKBASI. Photocatalytic antibacterial activity of TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> thin films:: the effect of composition on cell adhesion and antibacterial activity, *Journal of Photochemistry and Photobiology a: Chemistry*, [online]. 2014, 29-37 [cit. 2015-07-02]. ISSN 1010-6030. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603014001063>



### Citace obrázků v příloze:

- [35] Obrázek: fotokatalýza: Antimikrobiální aktivita oxidu titaničitého [online]. 2012 [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/antimikrobialni-aktivita-oxidu-titaniciteho>
- [36] Obrázek:  $TiO_2$  - dokonalá fotokatalitická čistička vzduchu: Jak to funguje [online]. [cit. 2015-11-01]. Dostupné z: <http://www.tio2.cz/informace/jak-to-funguje>
- [37] MARTIN KOZÁK. Obrázek: Soubor:ElmgSpektrum.png: Wikimedia Commons [online]. 14 April 2007 [cit. 2015-11-01]. Dostupné pod licencí Creative Commons z: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e3/ElmgSpektrum.png>
- [38] Obrázek: Stukturní typy. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita. [online]. [cit. 2014-12-20]. Dostupné z: <http://www.chemi.muni.cz/~lobl/Projekt/Projekt.html>
- [39] Obrázek: Dip coating. [online]. [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://www.nadetech.com/index.php/en/technologies>
- [40] Obrázek: Fluorescence, energetické hladiny: WikiSkripta [online]. [cit. 2015-07-02]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Fluorescence>
- [41] BRAIN, Marshall. Obrázek: *E. coli: How Cells Work* [online]. [cit. 2015-10-05]. Dostupné z: <http://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/cell1.htm>

## Seznam tabulek

---

Tabulka 1: IsoMet 1000 .....	33
Tabulka 2: BLB UVA Philips .....	33
Tabulka 3: UVX model UVX-36 .....	34
Tabulka 4: Columbus Instruments Micro-Oxymax .....	35
Tabulka 5: ICP OES .....	35
Tabulka 6: Určení koncentrace bakterií dle absorpance .....	36
Tabulka 7: kód: M001 .....	37
Tabulka 8: kód: M011 .....	38
Tabulka 9: kód: M002 .....	38
Tabulka 10: Měření č. 1 .....	47
Tabulka 11: Měření č. 2 .....	47
Tabulka 12: Měření č. 3 .....	48
Tabulka 13: Měření č. 4 .....	48
Tabulka 14: Posouzení účinnosti fotokatalyzátoru .....	49
Tabulka 15: Analýza ICP .....	54

## Seznam grafů

---

Graf 1: Spirometrie .....	45
Graf 2: Celkové počty bakteriální populace E. coli .....	46
Graf 3: Jednofaktoriální ANOVA v MATLABU: Vzorky s fotoaktivním nátěrem se liší v situacích světlo (menší) a tma (větší), (Zdroj: autor). .....	52

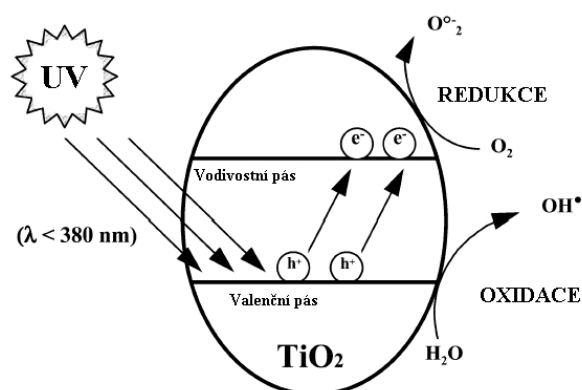
## Seznam obrázků

---

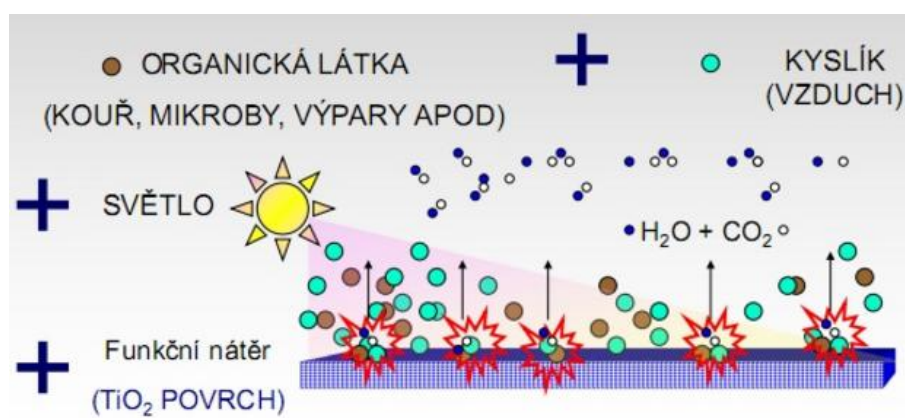
Obrázek 1: Sterilizátor Chirana řada HS 62A (Zdroj: autor). .....	40
Obrázek 2: Autokláv: UNISTERI HP (Zdroj: autor). .....	40
Obrázek 3: Spirometr Columbus Instruments Micro-Oxyma (Zdroj: autor). .....	41
Obrázek 4: Schéma přípravy metody (ISO 27447). Na obrázku je vzorek (+ duplicitní vzorek) pod UV lampou (Zdroj: autor). .....	43
Obrázek 5: Ideální počet E. coli (Zdroj: autor) .....	44
Obrázek 6: Přemnožené bakterie E. coli (Zdroj: autor) .....	44
Obrázek 7: Kontrola pod UV lampou (Zdroj: autor) .....	50
Obrázek 8: Kontrola ve tmě (Zdroj: autor) .....	50
Obrázek 9: Fotoaktivní vrstva pod UV lampou (Zdroj: autor) .....	50
Obrázek 10: Fotoaktivní vrstva ve tmě (Zdroj: autor) .....	50
Obrázek 11 A) Fotoaktivní vrstvy potažené na sklíčkách metodou Dip coating (Zdroj: autor). .....	53
Obrázek 12 B) Fotoaktivní vrstvy potažené na sklíčkách metodou Dip coating (Zdroj: autor). .....	53

Obrázek 13: Popis průběhu fotokatalýzy [35].....	65
Obrázek 14: Fotokatalytická reakce [36] .....	65
Obrázek 15 Elektromagnetické spektrum, ultrafialové záření (růžové zvýraznění). [37] .....	65
Obrázek 16: Tetragonální mřížka Rutilu (vlevo), anatasu (vpravo). [38].....	66
Obrázek 17: Dip coating [39].....	66
Obrázek 18: Energetické hladiny – fluorescence [40] .....	66
Obrázek 19: Schéma metody, ISO 27447 [14] .....	67
Obrázek 20: Bakterie E. coli [41] .....	67

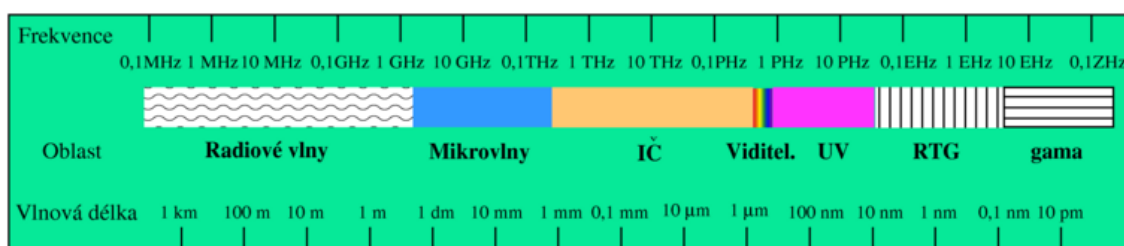
## Seznam příloh



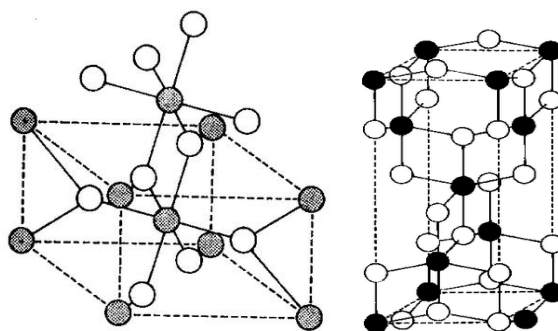
Obrázek 13: Popis průběhu fotokatalýzy [35]



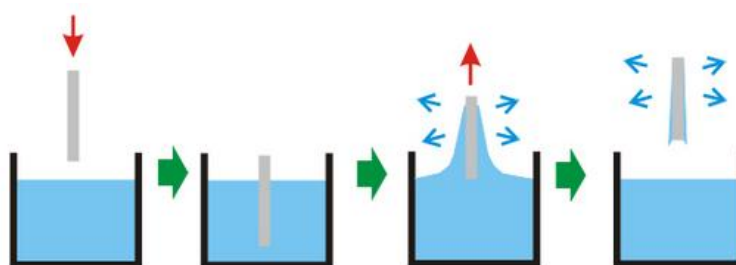
Obrázek 14: Fotokatalytická reakce [36]



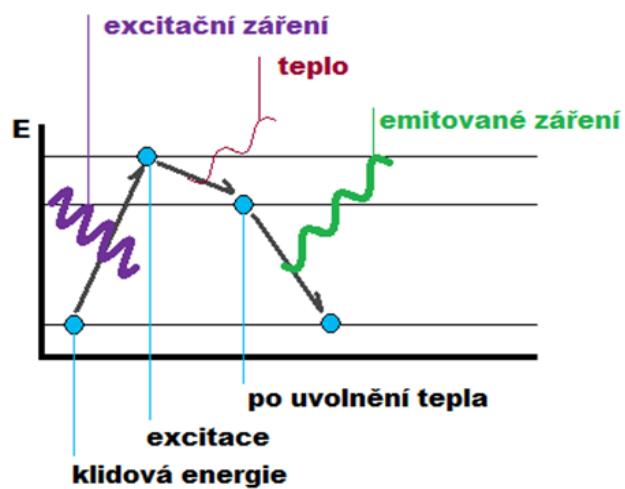
Obrázek 15 Elektromagnetické spektrum, ultrafialové záření (růžové zvýraznění). [37]



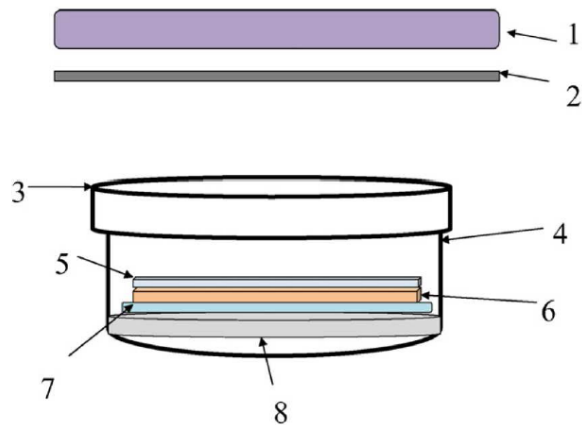
Obrázek 16: Tetragonální mřížka Rutilu (vlevo), anatasu (vpravo). [38]



Obrázek 17: Dip coating [39]

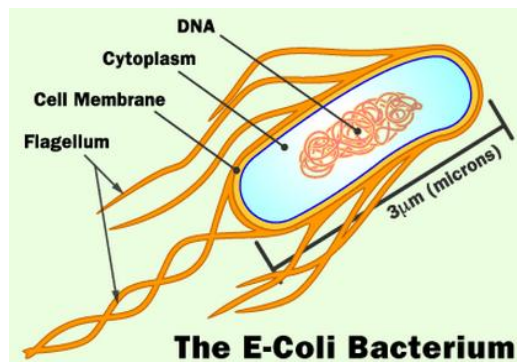


Obrázek 18: Energetické hladiny – fluorescence [40]



Obrázek 19: Schéma metody, ISO 27447 [14]

Legenda: 1) zdroj UV záření, 2) kovová deska, 3) skleněné víčko, 4) Petriho miska, 5) přilnavá skleněná nebo plastová vrstva, 6) testovaný vzorek s vrstvou bakteriální suspenze s *E. coli*, 7) skleněná trubička, 8) filtrační papír [14]



Obrázek 20: Bakterie *E. coli* [41]